



Instituto-Fundación Teófilo Hernando de I+D del Medicamento
Departamento de Farmacología y Terapéutica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

**DERIVADOS DE GRAMINA CON ACTIVIDAD DUAL
SOBRE CANALES DE CALCIO
Y SERINA/TREONINA FOSFATASAS:
NUEVA ESTRATEGIA MULTIDIANA PARA EL
TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Memoria presentada por
Dña. María Rocío Lajarín Cuesta
para optar al Grado de Doctor con mención “Doctor Internacional”

Director:
Dr. Cristóbal de los Ríos Salgado

Madrid, 2016



Departamento de Farmacología y Terapéutica

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Madrid

Don **CRISTÓBAL DE LOS RÍOS SALGADO**, investigador postdoctoral “Miguel Servet” del Instituto de Investigación Sanitaria, Hospital Universitario de La Princesa, CERTIFICA:

Que Doña **MARÍA ROCÍO LAJARÍN CUESTA** ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación ***“DERIVADOS DE GRAMINA CON ACTIVIDAD DUAL SOBRE CANALES DE CALCIO Y SERINA / TREONINA FOSFATASAS: NUEVA ESTRATEGIA MULTIDIANA PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER”***, con objeto de obtener el Grado de Doctor con mención “Doctor Internacional” por la Universidad Autónoma de Madrid.

Como director del trabajo hago constar que ha sido realizado con todas las garantías técnicas y metodológicas, y que las conclusiones obtenidas son plenamente válidas, siendo considerado, por tanto, apto para ser presentado como Tesis Doctoral.

Para que conste a efectos oportunos, expido y firmo la presente en Madrid a 3 de Octubre de 2016.

Dr. Cristóbal de los Ríos Salgado

Investigador Postdoctoral “Miguel Servet”

*A mis padres y
a mis hermanas.
A Gabi.*

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ACh	Acetilcolina (del inglés <i>acetylcholine</i>)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico
Anal. Elem.	Análisis elemental
AO	Ácido okadaico
APP	Proteína precursora de amiloide (del inglés <i>amyloid precursor protein</i>)
Ar	Aromáticos
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
BACE-1	<i>Beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1</i>
bd	Doblete ancho (del inglés <i>broad doublet</i>)
BHE	Barrera hematoencefálica
Bn	Bencilo
bs	Singlete ancho (del inglés <i>broad singlet</i>)
c	Cuartete
calc.	Calculado
CaMKII	Proteína cinasa dependiente de calcio y calmodulina II
ccb	Células cromafines bovinas
CCDV	Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje
cdk-5	Proteína cinasa dependiente de ciclina 5
CI₅₀	Concentración inhibidora 50
CICR	Liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (<i>calcium induced calcium release</i>)
CIP2A	<i>Oncoprotein cancerous inhibitor of PP2A</i>
CK-1	Caseína cinasa 1
ClogP	Logaritmo de P calculado
Cn	Calcineurina
CNDV	Canales de Na^{+} dependientes de voltaje
col.	colaboradores
Comp	Compuestos
d	Doblete
dd	Doble doblete
ddd	Doble doblete de dobletes
dm	Doblete de multipletes
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida

DMSO	Dimetilsulfóxido
EA	Enfermedad de Alzheimer
EHT	<i>N</i> -eicosanoilserotonina
EMAR	Espectrometría de masas de alta resolución
EMEM	Medio esencial mínimo de Eagle
Equiv	Equivalente
Glu	Glutamato
Gra	Gramina
GSK-3β	Cinasa glicógeno sintasa 3β
HEAT	<i>Huntingtin-elongation-A subunit-TOR</i>
I+D	Investigación y desarrollo
I₁^{PP1}	Inhibidor endógeno 1 de PP1
I₁^{PP2A}	Inhibidor endógeno 1 de PP2A
I₂^{PP1}	Inhibidor endógeno 2 de PP1
I₂^{PP2A}	Inhibidor endógeno 2 de PP2A
I_{Ca}	Corrientes de Ca ²⁺
I_{Na}	Corrientes de Na ⁺
IP₃	Inositol-(1,4,5)-trifosfato
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
LCMT-1	Leucina carboxilo metiltransferasa 1
lit.	Literatura
LTD	Depresión a largo plazo (del inglés <i>long term depression</i>)
LTP	Potenciación a largo plazo (del inglés <i>long term potentiation</i>)
m	Multiplete
MAO-A	Monoamino oxidasa tipo A
MAO-B	Monoamino oxidasa tipo B
MAP	Proteínas cinasas activadas por mitógeno
Mel	Melatonina
Mem	Memantina
MTT	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio
<i>n</i>-Bu	<i>n</i> -Butilo
NFT	Ovillos neurofibrilares (del inglés <i>neurofibrillary tangles</i>)
Nife	Nifedipino
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartato
O₂^{•-}	Radical superóxido
OMS	Organización Mundial de la Salud

PAD	Fármacos activadores de PP2A (del inglés <i>PP2A-activating drugs</i>)
Pf	Punto de fusión
Pi	Piperidinil
PIP	Proteínas que interaccionan con PP1
PKA	Proteína cinasa A
PM	Peso molecular
PME-1	PP2A-metilesterasa 1
pNPP	<i>p</i> -nitrofenilfosfato
PP1	Ser/Thr fosfoproteína fosfatasa 1
PP1c	Subunidad catalítica de PP1
PP2A	Ser/Thr fosfoproteína fosfatasa 2A
PP2Ac	Subunidad catalítica de PP2A
PP4	Ser/Thr fosfoproteína fosfatasa 4
PP5	Ser/Thr fosfoproteína fosfatasa 5
PP6	Ser/Thr fosfoproteína fosfatasa 6
PP7	Ser/Thr fosfoproteína fosfatasa 7
ppm	Partes por millón
PPP	Fosfoproteínas fosfatasa (del inglés <i>phosphoprotein phosphatases</i>)
PSA	Área de superficie polar (del inglés <i>polar surface area</i>)
PSEN-1	Presenilina 1
PSEN-2	Presenilina 2
PTPA	Activador fosfotirosil fosfatasa (<i>phosphotyrosyl phosphatase activator</i>)
R/O	Rotenona y Oligomicina A
RE	Retículo endoplasmático
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNS	Especies reactivas de nitrógeno (del inglés <i>reactive nitrogen species</i>)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (del inglés <i>reactive oxygen species</i>)
Rto	Rendimiento
RyR	Receptores de rianodina
SAPK	Proteínas cinasas activadas por estrés
Ser	Serina
SERCA	Bomba de Ca ²⁺ ATPasa del retículo sarco(endo)plasmático
SFB	Suero fetal bovino
SIdI	Servicio Interdepartamental de Investigación de la UAM
S_N2	Sustitución nucleófila bimolecular
S_NAr	Sustitución nucleófila aromática

SOC	Canales de Ca^{2+} capacitativos
t	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
TBDPS	Tert-butildifenilsilano
THF	Tetrahidrofurano
Thr	Treonina
TLC	Cromatografía en capa fina (del inglés <i>thin layer chromatography</i>)
TTX	Tetrodotoxina
Tyr	Tirosina
Ver	Veratridina
βA	β -amiloide
δ	Desplazamiento químico
$[\text{Ca}^{2+}]_c$	Concentración de Ca^{2+} citosólica
$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_c$	Incremento de la concentración de Ca^{2+} citosólica
$\cdot\text{OH}$	Radical hidroxilo

ÍNDICE

I. MARCO DE LA TESIS	3
II. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	7
III. ABSTRACT / RESUMEN	11
IV. INTRODUCCIÓN	15
1. ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS	15
2. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	16
2.1. Introducción	16
2.2. Etiología	17
2.2.1. Hipótesis colinérgica	18
2.2.2. Hipótesis amiloide	19
2.2.3. Hipótesis tau	20
2.2.3.1. Serina/Treonina fosfoproteínas fosfatasas	23
2.2.4. Hipótesis de la desregulación del Ca^{2+} neuronal	33
2.2.4.1. Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV)	35
2.2.5. Otras causas: disfunción mitocondrial, estrés oxidativo y neuroinflamación	41
2.3. Tratamiento actual de la EA	43
3. ESTRATEGIA MULTIDIANA PARA EL DISEÑO DE FÁRMACOS	44
3.1. Justificación	44
3.2. Ejemplos de fármacos multidiana para la EA	45
V. HIPÓTESIS DE TRABAJO	51
VI. OBJETIVOS	55
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	59
1. MATERIALES Y MÉTODOS DE SÍNTESIS QUÍMICA, CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y ESTUDIO COMPUTACIONAL	59
1.1. Materiales utilizados	59
1.2. Métodos de caracterización estructural y determinación de la pureza de los compuestos	60
1.2.1. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	60
1.2.2. Espectrometría de Masas Molecular	60
1.2.3. Puntos de fusión (Pf)	60
1.2.4. Análisis químico elemental	60

1.2.5. Cristalografía de rayos X	61
1.3. Síntesis química de derivados de gramina	61
1.3.1. Procedimiento general I para la <i>N</i> -alquilación de 5-bromo-1 <i>H</i> -indol (a), 5-metil-1 <i>H</i> -indol (b), 1 <i>H</i> -indol (c) y 5-cloro-1 <i>H</i> -indol (d)	61
1.3.1.1. 1-bencil-5-bromo-1 <i>H</i> -indol (a1)	61
1.3.1.2. 5-bromo-1-butil-1 <i>H</i> -indol (a2)	62
1.3.1.3. 5-bromo-1-(prop-2-inil)-1 <i>H</i> -indol (a3)	62
1.3.1.4. 4-(5-bromo-1 <i>H</i> -indol-1-il)butanoato de etilo (a4)	62
1.3.1.5. 5-bromo-1-(4-clorobutil)-1 <i>H</i> -indol (a5)	62
1.3.1.6. 1-bencil-5-metil-1 <i>H</i> -indol (b1)	63
1.3.1.7. 1-butil-5-metil-1 <i>H</i> -indol (b2)	63
1.3.1.8. 5-metil-1-(prop-2-in-1-il)-1 <i>H</i> -indol (b3)	63
1.3.1.9. 1-(4-clorobutil)-5-metil-1 <i>H</i> -indol (b5)	63
1.3.1.10. 1-bencil-1 <i>H</i> -indol (c1)	64
1.3.1.11. 1-butil-1 <i>H</i> -indol (c2)	64
1.3.1.12. 1-(prop-2-in-1-il)-1 <i>H</i> -indol (c3)	64
1.3.1.13. 1-bencil-5-cloro-1 <i>H</i> -indol (d1)	64
1.3.1.14. 1-butil-5-cloro-1 <i>H</i> -indol (d2)	65
1.3.1.15. 5-cloro-1-(prop-2-in-1-il)-1 <i>H</i> -indol (d3)	65
1.3.2. Síntesis de 5-metoxi-1 <i>H</i> -pirrolo[2,3- <i>b</i>]piridina (f)	65
1.3.3. Procedimiento general II para la <i>N</i> ₁ -alquilación de las 1 <i>H</i> -pirrolo[2,3- <i>b</i>]piridinas (e) y (f)	66
1.3.3.1. 1-bencil-5-bromo-1 <i>H</i> -pirrolo[2,3- <i>b</i>]piridina (e1)	66
1.3.3.2. 5-bromo-1-butil-1 <i>H</i> -pirrolo[2,3- <i>b</i>]piridina (e2)	66
1.3.3.3. 5-bromo-1-(prop-2-in-1-il)-1 <i>H</i> -pirrolo[2,3- <i>b</i>]piridina (e3)	67
1.3.3.4. 1-bencil-5-metoxi-1 <i>H</i> -pirrolo[2,3- <i>b</i>]piridina (f1)	67
1.3.4. Procedimiento general III para la preparación de los 4-[(piperidin-1-il)butil]indoles a6 y b6	67
1.3.4.1. 5-bromo-1-(4-(piperidin-1-il)butil)-1 <i>H</i> -indol (a6)	68
1.3.4.2. 5-metil-1-(4-(piperidin-1-il)butil)-1 <i>H</i> -indol (b6)	68
1.3.5. Procedimiento general IV para la síntesis de 16 y 25 mediante los intermedios <i>N</i> -óxidos b7 y c7	68
1.3.5.1. <i>N</i> -óxido de <i>N,N</i> -dimetil-1-(5-metil-1 <i>H</i> -indol-3-il)metanamina (b7)	69
1.3.5.2. 5-metil-3-(piperidin-1-ilmetil)-1 <i>H</i> -indol (16)	69
1.3.5.3. <i>N</i> -óxido de 1-(1 <i>H</i> -indol-3-il)- <i>N,N</i> -dimetilmetanamina (c7)	69
1.3.5.4. 3-(piperidin-1-ilmetil)-1 <i>H</i> -indol (25)	70
1.3.6. Procedimiento general V para síntesis de los derivados 2–14 , 17–24 y 26–	

<i>1.3.6.1.</i>	1-(5-bromo-1 <i>H</i> -indol-3-il)- <i>N,N</i> -dimetilmetanamina (2)	71
<i>1.3.6.2.</i>	5-bromo-3-(piperidin-1-ilmetil)-1 <i>H</i> -indol (3)	71
<i>1.3.6.3.</i>	1-(1-bencil-5-bromo-1 <i>H</i> -indol-3-il)- <i>N,N</i> -dimetilmetanamina (4)	72
<i>1.3.6.4.</i>	1-bencil-5-bromo-3-(piperidin-1-ilmetil)-1 <i>H</i> -indol (5)	72
<i>1.3.6.5.</i>	1-(5-bromo-1-butil-1 <i>H</i> -indol-3-il)- <i>N,N</i> -dimetilmetanamina (6)	72
<i>1.3.6.6.</i>	5-bromo-1-butil-3-(piperidin-1-ilmetil)-1 <i>H</i> -indol (7)	73
<i>1.3.6.7.</i>	1-(5-bromo-1-(2-propinil)-1 <i>H</i> -indol-3-il)- <i>N,N</i> -dimetilmetanamina (8)	73
<i>1.3.6.8.</i>	5-bromo-3-(piperidin-1-ilmetil)-1-(2-propinil)-1 <i>H</i> -indol (9)	74
<i>1.3.6.9.</i>	5-bromo-1-(4-clorobutil)-3-(piperidin-1-ilmetil)-1 <i>H</i> -indol (10)	74
<i>1.3.6.10.</i>	1-(5-bromo-1-(4-(piperidin-1-il)butil)-1 <i>H</i> -indol-3-il)- <i>N,N</i> - dimetilmetanamina (11)	75
<i>1.3.6.11.</i>	5-bromo-1-(4-(piperidin-1-il)butil)-3-(piperidin-1-ilmetil)-1 <i>H</i> -indol (12)	75
<i>1.3.6.12.</i>	4-(5-bromo-3-((dimetilamino)metil)-1 <i>H</i> -indol-1-il)butanoato de etilo (13)	75
<i>1.3.6.13.</i>	4-(5-bromo-3-(piperidin-1-ilmetil)-1 <i>H</i> -indol-1-il)butanoato de etilo (14)	76
<i>1.3.6.14.</i>	1-(1-bencil-5-metil-1 <i>H</i> -indol-3-il)- <i>N,N</i> -dimetilmetanamina (17)	76
<i>1.3.6.15.</i>	1-bencil-5-metil-3-(piperidin-1-ilmetil)-1 <i>H</i> -indol (18)	77
<i>1.3.6.16.</i>	1-butil-5-metil-3-(piperidin-1-ilmetil)-1 <i>H</i> -indol (19)	77
<i>1.3.6.17.</i>	<i>N,N</i> -dimetil-1-(5-metil-1-(prop-2-in-1-il)-1 <i>H</i> -indol-3-il)metanamina (20)	78
<i>1.3.6.18.</i>	5-metil-3-(piperidin-1-ilmetil)-1-(prop-2-in-1-il)-1 <i>H</i> -indol (21)	78
<i>1.3.6.19.</i>	1-(4-clorobutil)-5-metil-3-(piperidin-1-ilmetil)-1 <i>H</i> -indol (22)	79
<i>1.3.6.20.</i>	<i>N,N</i> -dimetil-1-(5-metil-1-(4-(piperidin-1-il)butil)-1 <i>H</i> -indol-3-il)metanamina (23)	79
<i>1.3.6.21.</i>	5-metil-1-(4-(piperidin-1-il)butil)-3-(piperidin-1-ilmetil)-1 <i>H</i> -indol (24)	80
<i>1.3.6.22.</i>	1-(1-bencil-1 <i>H</i> -indol-3-il)- <i>N,N</i> -dimetilmetanamina (26)	80
<i>1.3.6.23.</i>	1-bencil-3-(piperidin-1-ilmetil)-1 <i>H</i> -indol (27)	81
<i>1.3.6.24.</i>	1-(1-butil-1 <i>H</i> -indol-3-il)- <i>N,N</i> -dimetilmetanamina (28)	81
<i>1.3.6.25.</i>	1-butil-3-(piperidin-1-ilmetil)-1 <i>H</i> -indol (29)	81
<i>1.3.6.26.</i>	<i>N,N</i> -dimetil-1-(1-(prop-2-in-1-il)-1 <i>H</i> -indol-3-il)metanamina (30)	82
<i>1.3.6.27.</i>	3-(piperidin-1-ilmetil)-1-(prop-2-in-1-il)-1 <i>H</i> -indol (31)	82
<i>1.3.6.28.</i>	5-cloro-3-(piperidin-1-ilmetil)-1 <i>H</i> -indol (32)	83
<i>1.3.6.29.</i>	1-(1-bencil-5-cloro-1 <i>H</i> -indol-3-il)- <i>N,N</i> -dimetilmetanamina (33)	83
<i>1.3.6.30.</i>	1-bencil-5-cloro-3-(piperidin-1-ilmetil)-1 <i>H</i> -indol (34)	84
<i>1.3.6.31.</i>	1-(1-butil-5-cloro-1 <i>H</i> -indol-3-il)- <i>N,N</i> -dimetilmetanamina (35)	84
<i>1.3.6.32.</i>	1-butil-5-cloro-3-(piperidin-1-ilmetil)-1 <i>H</i> -indol (36)	85

1.3.6.33.	1-(5-cloro-1-(prop-2-in-1-il)-1 <i>H</i> -indol-3-il)- <i>N,N</i> -dimetilmetanamina (37)	85
1.3.6.34.	5-cloro-3-(piperidin-1-ilmetil)-1-(prop-2-in-1-il)-1 <i>H</i> -indol (38)	86
1.3.6.35.	1-(1-bencil-5-bromo-1 <i>H</i> -pirrolo[2,3- <i>b</i>]piridin-3-il)- <i>N,N</i> -dimetilmetanamina (39)	86
1.3.6.36.	1-bencil-5-bromo-3-(piperidin-1-ilmetil)-1 <i>H</i> -pirrolo[2,3- <i>b</i>]piridina (40)	86
1.3.6.37.	1-(5-bromo-1-butil-1 <i>H</i> -pirrolo[2,3- <i>b</i>]piridin-3-il)- <i>N,N</i> -dimetilmetanamina (41)	87
1.3.6.38.	5-bromo-1-butil-3-(piperidin-1-ilmetil)-1 <i>H</i> -pirrolo[2,3- <i>b</i>]piridina (42)	87
1.3.6.39.	1-(5-bromo-1-(prop-2-in-1-il)-1 <i>H</i> -pirrolo[2,3- <i>b</i>]piridin-3-il)- <i>N,N</i> -dimetilmetanamina (43)	88
1.3.6.40.	5-bromo-3-(piperidin-1-ilmetil)-1-(prop-2-in-1-il)-1 <i>H</i> -pirrolo[2,3- <i>b</i>]piridina (44)	88
1.3.6.41.	1-(1-bencil-5-metoxi-1 <i>H</i> -pirrolo[2,3- <i>b</i>]piridin-3-il)- <i>N,N</i> -dimetilmetanamina (45)	89
1.3.6.42.	1-bencil-5-metoxi-3-(piperidin-1-ilmetil)-1 <i>H</i> -pirrolo[2,3- <i>b</i>]piridina (46)	89
1.4.	Estudio computacional	90
1.5.	Cálculo de parámetros fisicoquímicos	90
2.	MATERIALES Y MÉTODOS DE EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA	91
2.1.	Materiales utilizados	91
2.2.	Mantenimiento de las células en cultivo	91
2.2.1.	Línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y	91
2.2.2.	Cultivo primario de neuronas de corteza motora de rata	93
2.2.3.	Preparación de rodajas de hipocampo de rata	93
2.2.4.	Cultivo primario de células cromafines bovinas	94
2.3.	Experimentos de evaluación farmacológica	95
2.3.1.	Experimentos de neuroprotección en células SH-SY5Y	95
2.3.2.	Experimentos de toxicidad per se en células SH-SY5Y	95
2.3.3.	Medidas de Ca ²⁺ citosólico en células SH-SY5Y	95
2.3.4.	Experimentos de neuroprotección en neuronas de corteza motora	96
2.3.5.	Experimentos de toxicidad per se en neuronas de corteza motora	96
2.3.6.	Experimentos de neuroprotección en rodajas de hipocampo de rata	96
2.3.7.	Método de la reducción del MTT para la medición de la viabilidad celular	97
2.3.8.	Método del pNPP para la medición de la actividad fosfatasa	97

2.3.9. Medidas de corrientes de Ca^{2+} en células cromafines bovinas	98
2.3.10. Determinación de la expresión de fosfotau mediante <i>western blot</i>	99
2.4. Análisis estadístico y representación de datos farmacológicos	100
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	105
1. BÚSQUEDA DE UN NUEVO COMPUESTO ACTIVO O HIT: GRAMINA	
1.1. Introducción	105
1.2. Evaluación del perfil neuroprotector de la gramina en modelos <i>in vitro</i> relacionados con neurodegeneración	107
1.3. Estudios de anclaje molecular o docking de gramina y PP2A	111
1.4. Conclusiones parciales	116
2. DISEÑO DE NUEVOS DERIVADOS DE GRAMINA	
2.1. Introducción	117
2.2. Diseño de nuevos derivados en base a la estructura de ligandos conocidos	118
2.3. Diseño de nuevos derivados mediante técnicas de docking o anclaje molecular	120
2.4. Conclusiones parciales	123
3. SÍNTESIS ORGÁNICA Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS DERIVADOS DE GRAMINA	
3.1. <i>N</i> -alquilación de 5-bromo-1 <i>H</i> -indol (a), 5-metil-1 <i>H</i> -indol (b), 1 <i>H</i> -indol (c) y 5-cloro-1 <i>H</i> -indol (d)	125
3.2. Síntesis de 5-metoxi-1 <i>H</i> -pirrolo[2,3- <i>b</i>]piridina (f)	131
3.3. <i>N</i> ₁ -alquilación de las 1 <i>H</i> -pirrolo[2,3- <i>b</i>]piridinas e y f	132
3.4. Preparación de los 4-[(piperidin-1-il)butil]indoles a6 y b6	132
3.5. Ruta alternativa para la síntesis de los derivados 16 y 25 mediante los intermedios <i>N</i> -óxidos b7 y c7	133
3.6. Reacción de Mannich para la síntesis de los derivados 2–14 , 17–24 y 26–46	135
3.7. Discusión general	143
3.8. Conclusiones parciales	144
4. PREDICCIÓN DEL PASO DE BARRERA HEMATOENCEFÁLICA BASADO EN PROPIEDADES MOLECULARES	
4.1. Justificación	145

4.2. Aplicación del estudio de las propiedades moleculares en el diseño de fármacos	146
4.3. Propiedades fisicoquímicas determinantes para el paso de la barrera hematoencefálica	147
4.4. Resultados y discusión sobre el estudio del paso de barrera hematoencefálica de la gramina y sus derivados	148
4.5. Conclusiones parciales	152
5. ESTUDIO FARMACOLÓGICO DEL MECANISMO DE ACCIÓN	
5.1. Efecto sobre los incrementos de Ca^{2+} inducidos por despolarización	153
5.2. Efecto sobre las Ser/Thr fosfatasas	162
5.3. Derivados de gramina con actividad multidiana sobre los CCDV y la actividad fosfatasa	173
5.4. Conclusiones parciales	175
6. EVALUACIÓN DEL PERFIL NEUROPROTECTOR	
6.1. Toxicidad <i>per se</i> de los derivados de gramina	177
6.2. Modelo de sobrecarga de Ca^{2+} inducido por veratridina en neuronas de corteza motora de rata	181
6.3. Modelo de hiperfosforilación de tau inducido por ácido okadaico en células SH-SY5Y	184
6.4. Efecto de la gramina y algunos derivados sobre la expresión de tau hiperfosforilada	188
6.5. Modelo de estrés oxidativo inducido por rotenona/oligomicina A en células SH-SY5Y	189
6.6. Modelo de excitotoxicidad inducido por glutamato en rodajas de hipocampo de rata	193
6.7. Conclusiones parciales	195
IX. CONCLUSIONS / CONCLUSIONES	199
X. BIBLIOGRAFÍA	203
XI. ANEXOS	227
1. ESPECTROS DE RMN DE ^1H Y DE ^{13}C DE LOS DERIVADOS 2, 14 Y 18	227
2. CRISTALOGRAFÍA DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X	223

I. MARCO DE LA TESIS

I. MARCO DE LA TESIS DOCTORAL

Esta Memoria de Tesis para la obtención de Grado de Doctor se ha realizado bajo la tutela del Dr. Cristóbal de los Ríos Salgado, en el laboratorio L8 perteneciente al Instituto Fundación Teófilo Hernando de I+D del Medicamento y al Departamento de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de Madrid. La principal línea de investigación del grupo es el desarrollo de innovadoras estrategias terapéuticas y nuevos compuestos con propiedades neuroprotectoras para el potencial tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer.

II. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

II. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El incremento de la calidad de vida conlleva un cambio en la estructura demográfica de la sociedad, provocando un envejecimiento de la misma y el incremento en la incidencia y la prevalencia de las patologías asociadas a la vejez, tales como las enfermedades neurodegenerativas, entre las que destaca la enfermedad de Alzheimer.

La enfermedad de Alzheimer es la forma de demencia más prevalente. Tiene una repercusión económica y social de una enorme magnitud, difícilmente cuantificable y para la que no existe una solución terapéutica eficaz. La búsqueda de nuevos tratamientos alternativos constituye un área prioritaria de investigación. Dada su naturaleza multifactorial, la búsqueda de compuestos multidiana se ha convertido en una estrategia terapéutica atractiva para descubrir fármacos eficaces para su tratamiento. A pesar de las numerosas dianas sobre las que se puede intervenir, la mayoría de los ligandos multidiana descritos buscan combinar la estrategia clásica de inhibir la actividad de la enzima acetilcolinesterasa junto con otras propiedades neuroprotectoras como la quelación de metales, los antioxidantes, los antiagregantes de βA o los inhibidores de enzimas cinasas.

En este proyecto se plantea como hipótesis de trabajo una nueva estrategia, no explorada hasta la fecha, para el descubrimiento de fármacos enfocados al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, basada en el abordaje simultáneo de la homeostasis del Ca^{2+} y la actividad Ser/Thr fosfatasa. Existen numerosas evidencias que muestran la implicación de ambas dianas farmacológicas en la etiopatogenia de la enfermedad. Si bien cada una está siendo estudiada de manera individual, nuestro grupo de investigación es el primero en proponer esta estrategia multidiana como un posible tratamiento para la enfermedad de Alzheimer.

III. ABSTRACT / RESUMEN

III. ABSTRACT

Given the multifactorial nature of Alzheimer's disease, it exists an increasing interest in the development of neuroprotective drugs able to interact with two or more biological targets involved in the neurodegenerative process. The Ca^{2+} ion plays a central role in many cellular processes, so its intracellular concentration must be tightly regulated to avoid the outbreak of pathological events. Thus, compounds capable of regulating the intracellular Ca^{2+} signaling have been classically studied for the treatment of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease. Furthermore, one of the pathophysiological features of the disease is the neurofibrillary tangles, formed by hyperphosphorylated tau proteins. The imbalance in the phosphorylation of tau is due to, among other causes, a decrease in the activity of the Ser/Thr phosphatase enzymes that catalyze the removal of phosphate groups at tau, among which the phosphoprotein phosphatase 2A outstands.

The research of this PhD dissertation aims the discovery of novel neuroprotective compounds, proposing an innovative strategy based on the simultaneous therapeutic approach over Ca^{2+} dyshomeostasis and Ser/Thr phosphatase activity. Taking the natural alkaloid gramine as hit compound, for its potential activity on both biological targets, the design and synthesis of a total of 44 compounds is presented, as well as the evaluation of their pharmacological activity. In general, gramine and its derivatives decrease the Ca^{2+} entry into the cell, measured by the Fluo-4 fluorescent probe, presumably through a blockade of the voltage-gated Ca^{2+} channels, based on the results obtained by patch-clamp techniques. Moreover, they are able to maintain the Ser/Thr phosphatase activity, compromised by the presence of the selective inhibitor okadaic acid, being their affinity for PP2A enzyme confirmed by molecular docking studies. Finally, the dual activity of the compounds can protect neurons against toxic stimuli related to Alzheimer's disease, such as hyperphosphorylation of tau protein, oxidative stress, Ca^{2+} overload and excitotoxicity.

Based on the obtained results, we propose this multitarget strategy as an innovative and promising approach for the treatment of Alzheimer's disease, being its modulation feasible through this new family of neuroprotective compounds derived from gramine.

RESUMEN

Dada la naturaleza multifactorial de la enfermedad de Alzheimer, existe un creciente interés en el desarrollo de compuestos neuroprotectores capaces de interaccionar con dos o más dianas biológicas involucradas en el proceso neurodegenerativo. El ión Ca^{2+} juega un papel central en muchos procesos celulares, por lo que su concentración intracelular debe estar estrechamente regulada, para evitar el desencadenamiento de eventos patológicos. Por esto, compuestos capaces de regular su señalización intracelular han sido clásicamente estudiados para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer. Por otro lado, una de las características histopatológicas de la enfermedad son los ovillos neurofibrilares, formados por la proteína tau hiperfosforilada. Este desequilibrio en los niveles de fosforilación de tau se debe, entre otras causas, a una disminución de la actividad de las enzimas Ser/Thr fosfatasas, responsables de catalizar la eliminación de los grupos fosfato, entre las que destaca la fosfoproteína fosfatasa 2A.

La línea de investigación de esta Memoria de Tesis está dirigida al descubrimiento de nuevos compuestos neuroprotectores, proponiéndose una estrategia innovadora basada en el abordaje simultáneo de la dishomeostasis del Ca^{2+} y la actividad enzimática de las Ser/Thr fosfatasas. Tomando el alcaloide natural gramina como compuesto de partida, por su potencial actividad dual sobre ambas dianas de interés, se presenta el diseño y síntesis de un total de 44 compuestos, así como la evaluación de su actividad farmacológica. En general, la gramina y sus derivados disminuyen la entrada de Ca^{2+} al interior celular, medido mediante la sonda fluorescente Fluo-4, presumiblemente a través de un bloqueo de los CCDV, en base a los resultados obtenidos mediante técnicas de *patch-clamp*. Además, son capaces de mantener la actividad Ser/Thr fosfatasa, comprometida por la presencia del inhibidor AO, confirmándose su afinidad por la enzima PP2A mediante estudios de *docking* molecular. Por último, la actividad dual de los compuestos es capaz de proteger a las neuronas frente a estímulos tóxicos relacionados con la enfermedad de Alzheimer, como son la hiperfosforilación de la proteína tau, el estrés oxidativo, la sobrecarga de Ca^{2+} y la excitotoxicidad.

En base a los resultados obtenidos, se propone esta estrategia multidiana como una aproximación innovadora y prometedora para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, siendo su abordaje factible gracias a esta nueva familia de compuestos neuroprotectores derivada de gramina.

IV. INTRODUCCIÓN

IV. INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por una pérdida progresiva de neuronas en diferentes regiones del sistema nervioso, con el consiguiente deterioro funcional de las partes afectadas, mostrando signos y síntomas neurológicos característicos de cada una de ellas. Son enfermedades crónicas y progresivas que conllevan alteraciones en funciones corporales como la movilidad, el habla, la memoria, los sentimientos, la capacidad de tomar decisiones, la respiración o la función cardíaca. Todas estas alteraciones afectan no solo a quien las padece, sino también a su entorno familiar más cercano, generando un gran sufrimiento social ^[1]. El aumento de la esperanza de vida está unido, de manera inherente, al incremento de estas patologías, puesto que su principal factor de riesgo es el envejecimiento. En España, un 2 % de la población padece alguna enfermedad neurodegenerativa, siendo muy previsible su aumento en los próximos años ^[1].

Este grupo de enfermedades incluye patologías como la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica, entre otras. Aunque cada enfermedad tiene sus alteraciones moleculares específicas y unas manifestaciones clínicas concretas, existe una serie de mecanismos patogénicos comunes a todas ellas. Estos son la alteración en la fosforilación de proteínas, el mal plegamiento y la agregación aberrante de estas, la dishomeostasis del Ca^{2+} y de ciertos metales traza, la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo (Figura 1) ^[2].

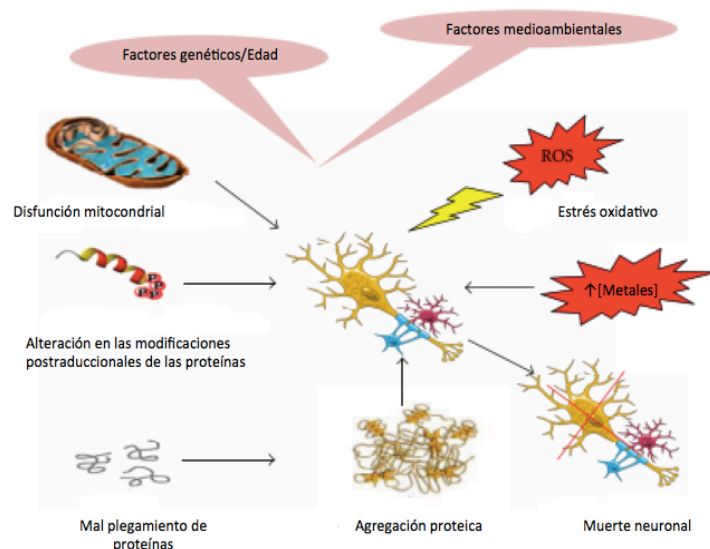


Figura 1. Factores comunes asociados a las enfermedades neurodegenerativas. Modificada de Sheik y col., 2013.

Tras muchos años de investigación, numerosas evidencias respaldan la etiología multifactorial de las enfermedades neurodegenerativas y, aunque se han probado numerosas terapias farmacológicas dirigidas a su prevención y tratamiento, estas, eminentemente paliativas y sintomáticas, no han sido efectivas ^[2]. Por ello, existe una urgente necesidad de descubrir nuevos fármacos capaces de retrasar, frenar o curar estas enfermedades. Entre todas las enfermedades neurodegenerativas, la EA destaca por ser la más prevalente, siendo la patología en la que se centrará esta Memoria de Tesis.

2. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

2.1. Introducción

En el año 2012, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció la demencia como una prioridad para la salud pública ^[3], dada su alta prevalencia, el coste asociado y la ausencia de cura disponible en el horizonte. La OMS apunta que en el año 2010 había 35,6 millones de personas viviendo con demencia en el mundo, que cada año hay 7,7 millones de casos nuevos y que las cifras se duplicarán cada 20 años. El costo asociado a esta epidemia global se calcula en 600.000 millones de dólares estadounidenses al año ^[3].

La demencia es un síndrome neurodegenerativo causado por una serie de alteraciones cerebrales que afectan a la memoria, la función cognitiva, el comportamiento, la habilidad de desempeñar las actividades cotidianas y las emociones. La EA es la forma más común de demencia y probablemente contribuye en un 60-70 % de los casos, siendo la enfermedad neurodegenerativa de mayor prevalencia. Otras formas frecuentes de demencia son la demencia vascular, la demencia con cuerpos de Lewy y la demencia fronto-temporal. Los límites entre los subtipos son difusos y a menudo pueden coexistir formas mixtas. En la actualidad, no se dispone de ningún tratamiento para curar o siquiera alterar el avance de la demencia, por lo que el impacto en los enfermos, cuidadores y familiares es extremo.

La EA debe su nombre al patólogo y neurólogo alemán Alois Alzheimer, quien en 1901 identificó el primer caso en una mujer de 50 años de edad llamada Auguste Deter. En 1906, tras el fallecimiento de la paciente y durante una reunión de psiquiatría, el investigador presentó sus observaciones al examinar el cerebro *postmortem*: las placas seniles y los ovillos neurofibrilares (NFT, por sus siglas en inglés *neurofibrillary tangles*) (Figura 2). Un año después, publicó la primera descripción científica de la enfermedad: “Sobre un proceso patológico peculiar grave de la corteza cerebral” (traducción del alemán *Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde*) ^[4].

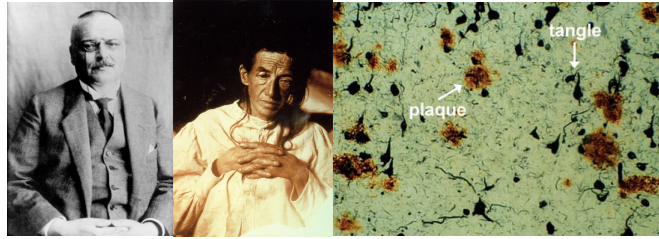


Figura 2. De izquierda a derecha: Alois Azheimer, descubridor de la EA. Augusta Deter, primera paciente diagnosticada con la EA. Placas seniles y ovillos neurofibrilares de paciente con la EA. Tomadas de J. J. Ezquerro, 2007.

El principal síntoma de la EA es una demencia progresiva, que comienza como una sutil pérdida de memoria y desorientación espaciotemporal. En una segunda fase, el enfermo pierde fluidez en el lenguaje y necesita de ayuda para realizar actividades cotidianas. En la fase avanzada, la incapacidad es absoluta, no reconoce a sus allegados, deja de hablar y aumenta la rigidez muscular de manera que queda recluso a una silla de ruedas y encamado ^[5]. Otros síntomas comunes son alteraciones en el comportamiento, como la agitación, la agresividad, la apatía o la depresión ^[5], culminando en la muerte prematura del paciente ^[6].

A grandes rasgos, el proceso patológico de la EA se identifica por la presencia de dos lesiones histopatológicas características: las placas seniles extracelulares y los ovillos neurofibrilares intracelulares, ambas asociadas a la muerte neuronal y la pérdida de sinapsis ^[5]. En el fenotipo más frecuente de EA, la neurodegeneración se inicia en la corteza entorrinal y el hipocampo, así como en otras estructuras relacionadas con el lóbulo temporal medio, extendiéndose progresivamente hacia áreas de asociación neocortical ^[7] ^[8], siendo las neuronas colinérgicas las más vulnerables.

2.2. Etiología

Los casos de EA se dividen en dos categorías: esporádicos y familiares. Los casos esporádicos son mayoritarios (> 90 %) y se caracterizan por una aparición de la enfermedad tardía, en personas mayores de 65 años, de severidad moderada a grave, desconociéndose la causa que la origina. La EA familiar puede aparecer a partir de los 30 años y su progresión es mucho más severa. Está ligada a mutaciones en genes que codifican para diferentes proteínas implicadas en la etiopatogenia de la enfermedad, siendo el factor genético de mayor riesgo el alelo $\epsilon 4$ del gen APOE ^[9].

Dado que la EA se desarrolla de manera asintomática durante décadas y no disponiéndose de herramientas de diagnóstico precoz, hay muchos estudios que tratan de establecer los posibles factores de riesgo que acaban desencadenando la aparición de la enfermedad. El primer factor de riesgo es el envejecimiento, puesto que el 90 % de los casos aparecen en personas mayores de 65 años, y su prevalencia aumenta de un 1 % con 65 años a un 40 % a los 90 años. Además, cada vez hay más estudios que demuestran que la diabetes, la obesidad, la inactividad física y mental, la depresión, el tabaco, bajos niveles de educación y la dieta favorecerían la aparición de la enfermedad, aunque todavía queda mucho por estudiar ^[10].

Desde que Alois Alzheimer describiese la enfermedad hace más de 100 años, su causa sigue siendo una incógnita. De lo que no cabe duda es que la EA, al igual que otras enfermedades neurodegenerativas, es una enfermedad multifactorial y sus manifestaciones clínicas son el resultado de múltiples procesos patológicos entre los cuales podemos destacar el procesamiento aberrante del péptido β -amiloide (β A), la hiperfosforilación de la proteína tau, la dishomeostasis del Ca^{2+} , el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y la neuroinflamación.

2.2.1. Hipótesis colinérgica

Surgió a mediados de la década de los 70 a raíz de ciertas observaciones que revelaban una neurodegeneración específica del sistema de neurotransmisión colinérgico en cerebros de pacientes con EA. En ellos, los niveles del neurotransmisor acetilcolina (ACh, por sus siglas en inglés *acetylcholine*) se encontraban claramente disminuidos ^[11], así como los niveles de acetiltransferasa de colina, la enzima responsable de su síntesis ^[12]. También se detectaron deficiencias en los sistemas de liberación de ACh ^[13], recaptación de colina ^[14] y una reducción en la densidad de receptores nicotínicos ^[15]. Además de estos déficits presinápticos, cabe resaltar que la ACh y el sistema de neurotransmisión colinérgico nicotínico están implicados en los procesos de aprendizaje y memoria, por lo que su alteración correlaciona con la sintomatología de la enfermedad ^[16].

Sin embargo, también hay otros neurotransmisores afectados a lo largo de la enfermedad, como por ejemplo el sistema de neurotransmisión glutamatérgico ^[17], ya que se observa una pérdida sustancial de neuronas glutamatérgicas, acompañada de alteraciones en la expresión de los receptores de *N*-metil-D-aspartato (NMDA) y de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico (AMPA) en la corteza cerebral y el hipocampo ^[17]. Además, tras la muerte neuronal, el glutamato es liberado al espacio extracelular, lo que aumenta la frecuencia de despolarización de la membrana postsináptica alterando la neurotransmisión fisiológica mediada por el receptor

de NMDA, lo que contribuye a la muerte por excitotoxicidad, que será explicada detalladamente más adelante ^[18].

2.2.2. Hipótesis amiloide

De acuerdo a esta hipótesis, postulada por Hardy y Higgins en 1992 ^[19], las placas seniles son las desencadenantes de una cascada patológica que incluye la formación de NFT, la muerte neuronal, el daño vascular y la demencia ^[20]. En otras palabras, la acumulación y agregación de β A sería la causa primaria de la EA ^[21].

El β A es un péptido formado por entre 36 y 43 aminoácidos fruto de la proteólisis secuencial de las enzimas β -secretasa y γ -secretasa sobre la proteína precursora de amiloide (APP, por sus siglas en inglés *amyloid precursor protein*) ^[22] ^[23]. La APP es una glicoproteína de membrana, presente en todas las células del organismo. En condiciones fisiológicas, parece estar involucrada en el desarrollo neuronal, en vías de supervivencia, en el crecimiento de neuritas y en la neurorreparación, si bien se desconocen los mecanismos exactos ^[24]. Existen dos rutas para el procesamiento proteolítico de la APP (Figura 3). En la vía no amiloidogénica, la APP es escindida por las enzimas α y γ -secretasa, dando lugar a una forma soluble de la APP que tiene propiedades neuroprotectoras ^[24]. A través de la vía amiloidogénica, el β A se produce tras la proteólisis de la APP por la acción de la enzima β -secretasa, también llamada BACE-1 (por sus siglas en inglés *beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1*), seguida de la γ -secretasa, cuyo centro catalítico está formado por las presenilinas 1 y 2 (PSEN-1 y PSEN-2, respectivamente) ^[21]. El papel fisiológico del β A parece estar relacionado con la prevención de una hiperactividad neuronal ^[25]. Cuando una neurona es estimulada, acompañando al proceso de liberación vesicular de neurotransmisores hay un incremento en la secreción de β A. Este β A liberado a la hendidura sináptica, en concentraciones fisiológicas, disminuye la transmisión excitatoria y previene una hiperactivación neuronal ^[25]. Aunque el β A es fundamentalmente extracelular, evidencias experimentales sugieren que también es capaz de difundir pasivamente a través de la membrana celular y acumularse intracelularmente, como por ejemplo en la mitocondria ^[26]. Mutaciones autosómicas dominantes en genes que codifican la APP, la PSEN-1 y la PSEN-2 dan lugar a una producción anómala de β A y a los casos familiares de EA ^[27].

Los niveles de β A se mantienen dentro de concentraciones fisiológicas gracias a las proteasas que lo degradan, entre las que destacan la neprilisina y la enzima degradadora de insulina. Sin embargo, estos sistemas de degradación de β A están disminuidos en pacientes con la EA ^[28] ^[29].

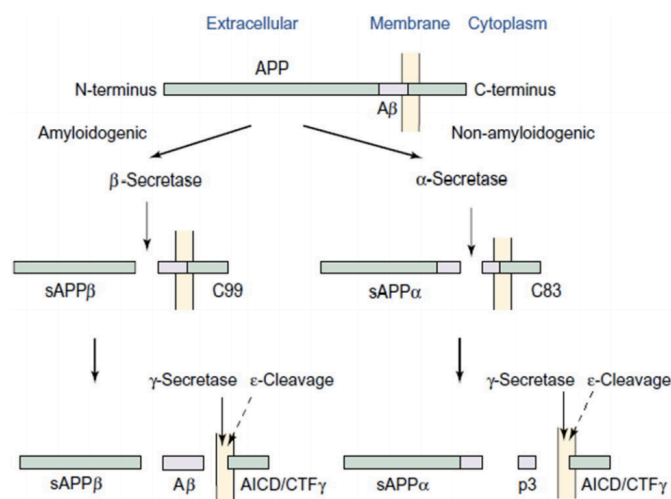


Figura 3. Procesamiento de la proteína precursora de amiloide. Tomada de Barage y Sonawanem, 2015.

La isoforma monomérica βA_{1-40} es la más prevalente, seguida de la βA_{1-42} , que es de naturaleza hidrofóbica y tiene una mayor tendencia a formar agregados. El βA tiende espontáneamente a autoagregarse, formando desde oligómeros solubles (2-6 péptidos) hasta polimerizar en fibrillas que se organizan en láminas β para formar las placas insolubles de βA [30]. La acumulación de βA y la formación de placas extracelulares llevan a una activación microglial local, liberación de citoquinas, astrocitosis reactiva y respuesta inflamatoria [31]. Como más adelante se explicará en detalle, el βA es capaz de producir especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS, respectivamente, por sus siglas en inglés *reactive oxygen species* y *reactive nitrogen species*) [32] [33], generando estrés oxidativo, e inducir así la peroxidación lipídica de la membrana plasmática, afectando al normal funcionamiento de las bombas de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} /ATPasas, transportadores de glucosa y de glutamato, conduciendo a una despolarización de la membrana y comprometiendo la producción energética celular [34]. También contribuye a la disfunción mitocondrial y a la dishomeostasis del Ca^{2+} [35] [36]. En último término, lleva a la pérdida de sinapsis y a la muerte neuronal [37].

Sin embargo, la patología amiloide no correlaciona de manera precisa con el deterioro cognitivo presente en los pacientes. Por esto, muchos autores defienden que el βA es el iniciador de una serie de procesos como la hiperfosforilación y la agregación de la proteína tau, que son los que finalmente median la neurodegeneración [38].

2.2.3. Hipótesis tau

Tau es la principal proteína asociada a microtúbulos y su importancia fisiológica radica en el papel que juega en el ensamblado y la estabilización de estos, así como en su organización

espacial y el transporte axonal ^[39]. Está codificada por el gen MAPT, situado en el cromosoma 17, del que se expresan seis isoformas de la proteína en el cerebro adulto ^[40]. Dentro de las neuronas, se encuentra predominantemente en los axones como fosfoproteína soluble ^[41]. Sin embargo, niveles anormales de fosforilación de esta proteína son la causa común en un grupo de enfermedades neurodegenerativas llamada taupatías ^[42], entre las que se encuentra la EA. Esta hiperfosforilación provoca diversas alteraciones funcionales. Por un lado, pierde afinidad por los microtúbulos, disociándose de estos y desestabilizándolos ^[43]. Esta desorganización conduce a la pérdida del transporte axonal, a una degeneración progresiva retrógrada y, finalmente, a la muerte neuronal ^[44]. Por otro lado, la hiperfosforilación de la proteína tau, que en condiciones nativas no está plegada, promueve su propia agregación en pares de filamentos helicoidales y filamentos rectos, que continúan acumulándose hasta formar los NFT, insolubles en el medio celular y que se acumulan principalmente en el soma ^[45]. Además, esta proteína tau aberrante es capaz de secuestrar dentro de los NFT a moléculas funcionales de tau y, en modelos animales, se ha observado cómo tau y sus agregados pueden ser secretados desde las neuronas y ejercer una propagación de la patología tipo prión, de neurona en neurona ^[46].

Las necropsias de los cerebros de pacientes con la EA han mostrado que los niveles de la proteína tau se encuentran aumentados ^[47], así como su fosforilación. Mientras que un cerebro sano tiene 2 moles de fosfato por cada mol de proteína tau, pacientes con la EA presentan hasta 8 moles de fosfato por cada mol de proteína ^[48]. El nivel de fosforilación de una proteína es el resultado de un balance entre la actividad enzimática de cinasas y fosfatasas. En la EA, existen evidencias que muestran que la proteína tau puede ser fosforilada hasta en 38 residuos diferentes de serina y treonina ^[49]. Son múltiples las cinasas involucradas en la hiperfosforilación de tau *in vivo*: la cinasa glicógeno sintasa 3 β (GSK-3 β , por sus siglas en inglés), la proteína cinasa dependiente de ciclina 5 (cdk-5, por sus siglas en inglés), la proteína cinasa A (PKA, por sus siglas en inglés), la proteína cinasa dependiente de calcio y calmodulina II (CaMKII, por sus siglas en inglés), la caseína cinasa 1 (CK-1), las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAP, dentro de las cuales destacan ERK 1 y ERK 2), y las proteínas cinasas activadas por estrés (SAPK, por sus siglas en inglés) ^{[50] [51] [52]}. Todas estas cinasas se han encontrado asociadas a NFT en cerebros de pacientes de EA, siendo las de mayor relevancia cdk5 y GSK-3 β ^[52]. Una única cinasa no es capaz de fosforilar todos los aminoácidos claves que inducen la disociación de tau y su agregación, es necesaria la participación de, al menos, dos cinasas. Por ejemplo, la fosforilación de tau por cdk5 promueve la subsiguiente fosforilación por GSK-3 β ^[51]. En el lado opuesto, las fosfoproteínas fosfatasas 2A y 1 (PP2A y PP1, respectivamente, por sus siglas en inglés) son las responsables del 90 % de la desfosforilación de la proteína tau. Dichas fosfatasas constituyen una de las dianas terapéuticas de interés para esta Memoria de Tesis, y serán descritas en profundidad en la sección 2.2.3.1.

La degradación de la proteína tau es llevada a cabo por calpaínas, proteasas activadas por calcio o vía proteasoma. Sin embargo, debido a su anormal estado de fosforilación y a otras modificaciones postraduccionales, como por ejemplo glicosilación, acetilación, ubiquitinación, truncación, etc., su degradación se ve impedida haciendo que los niveles de proteína tau hiperfosforilada en cerebros de pacientes con EA sean siete veces mayores que en los controles sanos ^{[53] [54]}.

Mutaciones en el gen MAPT causan demencia fronto-temporal, demostrando que la disfunción de tau es causa suficiente para provocar neurodegeneración y demencia clínica en ausencia de patología amiloide. Por el contrario, la toxicidad de β A requiere de una implicación de tau ^[55], lo que queda demostrado por el hecho de que existen personas con patología amiloide avanzada pero asintomáticos para la EA ^[56]. A nivel anatómico, las placas de β A aparecen primero en el córtex y solo en estadios avanzados se extienden hacia el interior cerebral. Sin embargo, la muerte neuronal empieza en la corteza entorrinal y el hipocampo, regiones donde escasean las placas de β A pero que precisamente son en las que se localizan inicialmente los NFT. Conforme avanza la enfermedad, los NFT se extienden hacia áreas corticales primarias ^[57]. En cuanto al curso temporal, según el estudio de Braak y col. ^[58], la patología tau precede a la aparición de la patología amiloide. Con la edad, los NFT se van acumulando en el hipocampo, pero se limitan a regiones del sistema límbico y es asintomático en personas libres de patología amiloide. Sin embargo, en personas con patología amiloide, la patología tau se extiende hacia regiones neocorticales, dando lugar a la EA. Así, son los niveles de tau hiperfosforilada y la presencia de NFT, y no la patología amiloide, quienes mejor correlacionan con el deterioro cognitivo en la EA, tanto anatómica como temporalmente (Figura 4) ^[59].

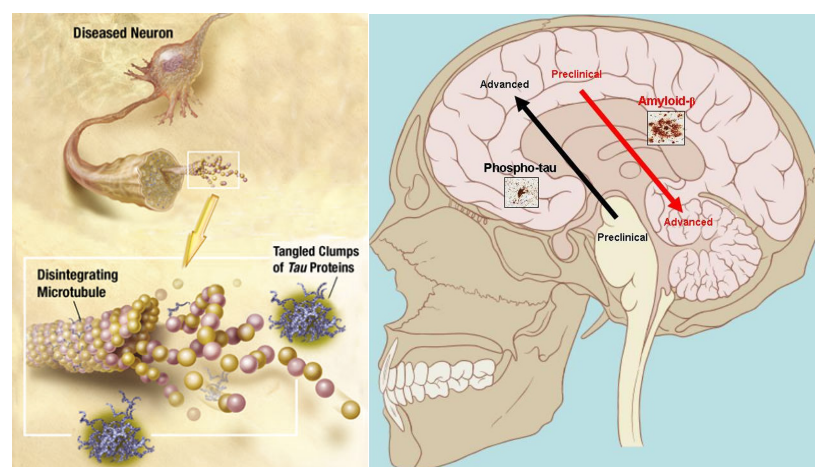


Figura 4. Izquierda, desestabilización de los microtúbulos y formación de los ovillos neurofibrilares. Derecha, progresión espaciotemporal de las placas de β -amiloide y los ovillos neurofibrilares. Tomadas de Castellani y col., 2014.

2.2.3.1. Serina/Treonina fosfoproteínas fosfatasas

La principal vía de regulación celular consiste en la fosforilación reversible de proteínas, llevada a cabo por enzimas cinasas y fosfatasas, sobre residuos de tirosina (Tyr) o serina y treonina (Ser/Thr); esta separación de funciones se debe a la diferente regioquímica que implica la formación del éster de fosfato o su hidrólisis sobre el fenol de Tyr o los alcoholes alifáticos presentes en Ser o Thr ^[60]. La unión del grupo fosfato, un grupo voluminoso y con carga negativa a pH fisiológico, afecta directamente a la función proteica provocando cambios conformacionales que alteran su función catalítica, su afinidad por distintos ligandos, su localización subcelular o su estabilidad ^[60]. Los procesos de fosforilación y desfosforilación deben estar estrechamente controlados ya que su desregulación se asocia con gran variedad de enfermedades como el cáncer, la diabetes, las enfermedades cardiovasculares o las enfermedades neurodegenerativas ^[61]. Aunque existen evidencias de que tanto las enzimas cinasas como las fosfatasas se encuentran alteradas en estos escenarios patológicos, la mayoría de los esfuerzos para diseñar nuevos compuestos han estado dirigidos a la inhibición de cinasas ^[62]. Esta discriminación se debe, en parte, a la creencia de que las fosfatasas son inespecíficas. Por cada 10 Ser/Thr cinasas, hay una única fosfatasa, y esto ha sido malinterpretado como que las fosfatasas son más promiscuas y por tanto no adecuadas para ser consideradas dianas farmacológicas. Sin embargo, evidencias recientes demuestran lo contrario y nos presentan a las fosfatasas como prometedoras, aunque desafiantes, dianas terapéuticas ^{[63] [61] [64]}.

Según su especificidad de sustrato, existen tres tipos de fosfatasas: Tyr fosfatasas, Ser/Thr fosfatasas y fosfatasas duales. Las Ser/Thr fosfatasas incluyen a las fosfoproteínas fosfatasas (PPP, por sus siglas en inglés *phosphoprotein phosphatases*), las proteínas fosfatasas dependientes de metales y las fosfatasas basadas en aspartato (Fcp/Scp) ^[65]. Esta Memoria de Tesis se centrará en las PPP, las cuales a su vez engloban a la fosfoproteína fosfatasa 1 (PP1), fosfoproteína fosfatasa 2A (PP2A), calcineurina (Cn, PP2C o PP3), fosfoproteína fosfatasa 4 (PP4), fosfoproteína fosfatasa 5 (PP5), fosfoproteína fosfatasa 6 (PP6) y fosfoproteína fosfatasa 7 (PP7). A pesar de tratarse de una superfamilia de enzimas, las enzimas PP1 y PP2A cubren el 90 % de la actividad Ser/Thr fosfatasa dentro de las células ^[66].

Todos los miembros de la familia de las PPP comparten una alta homología en el sitio catalítico, tanto en la secuencia de aminoácidos como en el mecanismo de reacción de la hidrólisis de ésteres de fosfato, catalizada por metales (Figura 5). Seis aminoácidos estrictamente conservados (tres histidinas, dos ácidos aspárticos y una asparragina) coordinan dos iones metálicos, que pueden ser Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} o Zn^{2+} ^[61]. Estos metales se coordinan con una molécula de agua, activándola para realizar un ataque nucleofílico sobre el fósforo,

eliminándolo del sustrato ^[67]. La mayoría de estas enzimas funcionan como holoenzimas, compuestas de una subunidad catalítica conservada y una gran variedad de subunidades reguladoras, que modulan la actividad de la primera, proveyéndolas de la especificidad de sustrato y una sublocalización celular específica ^[65].

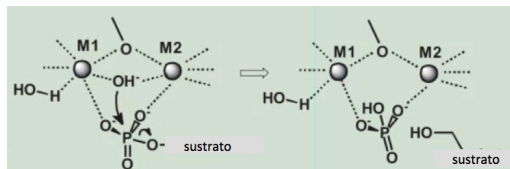


Figura 5. Mecanismo común de desfosforilación de las Ser/Thr fosfoproteínas fosfatasas. Dos iones metálicos (M1 y M2) coordinan una molécula de agua en el sitio catalítico. El ión hidroxilo realiza un ataque nucleofílico sobre el grupo fosfato del sustrato produciendo la desfosforilación del aminoácido. Modificada de Zhang y col., 2013.

Los primeros inhibidores de las PPP identificados fueron toxinas de origen natural, los cuales sirvieron como punto de partida para el desarrollo de compuestos con menor toxicidad y propiedades farmacológicas mejoradas ^[68]. Los principales inhibidores naturales son el ácido okadaico (AO), la cantaridina, la nodularina, las microcistinas, la caliculina A, la fostriecina y la tautomycin. Estas toxinas ejercen una inhibición de amplio espectro sobre las enzimas PPP a través de su unión al sitio activo, muy próximo a los dos iones metálicos, siendo calcineurina y PP7 las menos afectadas. Dado que la subunidad catalítica está tan conservada, especialmente entre PP1 y PP2A, la selectividad de estas toxinas por cada subtipo de fosfatasa es pequeña, mostrando valores de CI_{50} similares ^[61] ^[69].

Ser/Thr fosfoproteínas fosfatasas 1 (PP1) y 2A (PP2A)

En esta memoria de Tesis Doctoral es necesario destacar PP1 y PP2A, ya que realizan el 90 % de la actividad Ser/Thr fosfatasa celular ^[66], profundizando en PP2A por ser la principal enzima Ser/Thr fosfatasa implicada en la desfosforilación de la proteína tau y, por tanto, con potencial indicación para la EA.

PP1 es una Ser/Thr fosfatasa ubicua y de gran importancia por estar involucrada en un amplio rango de procesos celulares como la transcripción de genes, la síntesis de proteínas, el metabolismo de lípidos y glucógeno, la contracción muscular y la plasticidad sináptica. Existe como una holoenzima compuesta por una subunidad catalítica (PP1c, 37 kDa) unida a más de 50 subunidades reguladoras (PIP, proteínas que interaccionan con PP1) (Figura 6). Hay cuatro isoformas de PP1c (PP1 α , PP1 β/δ , PP1 γ 1 y PP1 γ 2), con los metales Mn^{2+} y Fe^{2+} situados en su sitio activo. Las PIP dotan a PP1 de una sublocalización celular específica y especificidad de

sustrato, e incluso pueden ser sustratos de PP1 por sí mismas. La interacción entre las PIP y PP1c ocurre principalmente a través de un motivo denominado RVxF, presente en más del 90 % de las PIP, y un bolsillo hidrofóbico RVxF/W de PP1c, situado remotamente respecto al sitio catalítico. Este bolsillo de reconocimiento está conservado solo en PP1c, por lo que los compuestos dirigidos a él serán selectivos para PP1. Los dos principales inhibidores endógenos de PP1 son I_1^{PP1} y I_2^{PP1} [65].

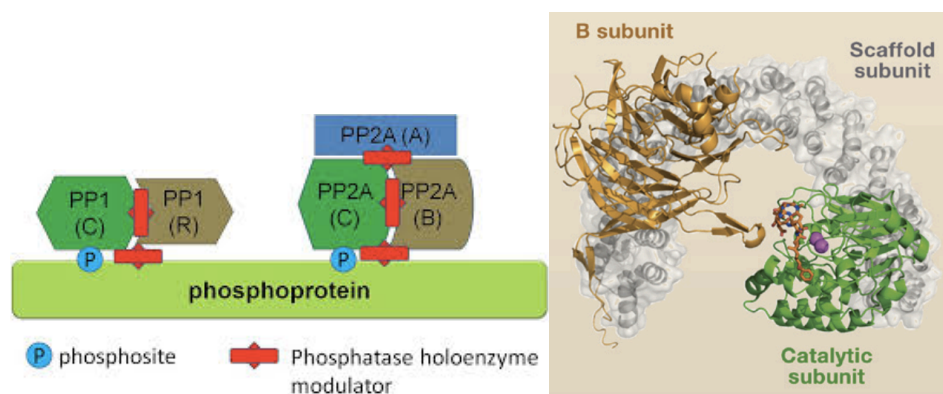


Figura 6. Izquierda, subunidades que conforman PP1 y PP2A. Derecha, estructura heterotrimérica de PP2A. Tomadas de Y. Shi, 2009.

PP2A es una de las enzimas más abundantes en las células eucariotas (1 % del total de las proteínas celulares) [70], expresada de manera ubicua y muy conservada desde levaduras hasta humanos. PP2A participa en vías celulares esenciales como el ciclo celular, el metabolismo, la migración y las vías de supervivencia, entre otras. Su alteración está asociada a múltiples patologías como el cáncer, la EA, la enfermedad de Parkinson o las enfermedades metabólicas. Se trata de una holoenzima heterotrimérica consistente en un núcleo heterodimérico y diferentes subunidades reguladoras (subunidad B) (Figura 6). Dentro del núcleo heterodimérico, la subunidad catalítica (C o PP2Ac, 36 kDa) está siempre asociada a la subunidad estructural (A o PR65, 65 kDa). Los iones metálicos presentes en el sitio catalítico fueron identificados como dos iones de Mn^{2+} por Xing y col [71]. Tanto la subunidad C como la A existen en dos isoformas, α y β . Las subunidades reguladoras incluyen cuatro familias: B (B55 o PR55), B' (B56 o PR61), B'' (PR48, PR72 o PR130) y B''' (PR93 o PR110), y cada familia presenta de 2 a 5 isoformas con poca similitud entre ellas. La subunidad A presenta 15 repeticiones en tándem tipo HEAT (por sus siglas en inglés *huntingtin-elongation-A subunit-TOR*), reconociendo la subunidad C las repeticiones HEAT 11-15 y la subunidad B las repeticiones HEAT 2-8 [65]. Estas subunidades nunca se encuentran por separado *in vivo* y, aunque dímeros AC sí son abundantes en tejidos, la forma predominante de PP2A son heterotrímeros, es decir, el núcleo AC junto con la subunidad B. La actividad enzimática completa de PP2A solo se consigue cuando la holoenzima heterotrimérica está formada. La diversidad de subunidades B con las que puede interactuar el núcleo AC (existen hasta 96 combinaciones), junto con sus diferentes

expresiones según el tipo de tejido y la célula, son los responsables de la especificidad de sustrato y sublocalización celular de las funciones de PP2A [65].

El mecanismo de regulación de PP2A es extraordinariamente complejo [72]. Tras la síntesis proteica de la subunidad C, para evitar que ejerza su actividad fosfatasa de manera indiscriminada, es inactivada mediante la unión de dos proteínas: $\alpha 4$ (que se une a la subunidad C libre) y PP2A-metilesterasa 1 (PME-1, que se une al dímero AC). Para generar las holoenzimas activas son necesarias enzimas reguladoras adicionales. En primer lugar, el activador fosfotirosil fosfatasa (PTPA, por sus siglas en inglés *phosphotyrosyl phosphatase activator*), con ATP y Mg^{2+} como cofactores necesarios, desfosforila PP2A en el residuo Tyr 307, promoviendo el plegamiento de la subunidad C en una conformación activa y permitiendo así a la enzima leucina carboxilo metiltransferasa 1 (LCMT-1) metilar el carboxilo terminal de la Leu 309 de PP2Ac. Esta metilación es clave, ya que aumenta la afinidad del núcleo catalítico hacia las subunidades B y permite la formación de la holoenzima heterotrimérica activa [72].

Por otro lado, en respuesta a diferentes estímulos celulares, enzimas p60^{v-src} y p56^{lck}, factores de crecimiento o receptores de insulina pueden inducir la fosforilación de la Tyr 307, dando lugar a la inactivación de PP2A. En estos casos, la enzima PTPA puede estimular a PP2A para que actúe como una Tyr fosfatasa (lo que la convertiría en una fosfatasa dual) y se reactive a sí misma mediante autodesfosforilación. Por último, la desmetilación de la Leu 309 por PME-1 también conduce a la inactivación de PP2A por pérdida de afinidad con las subunidades B (Figura 7) [73].

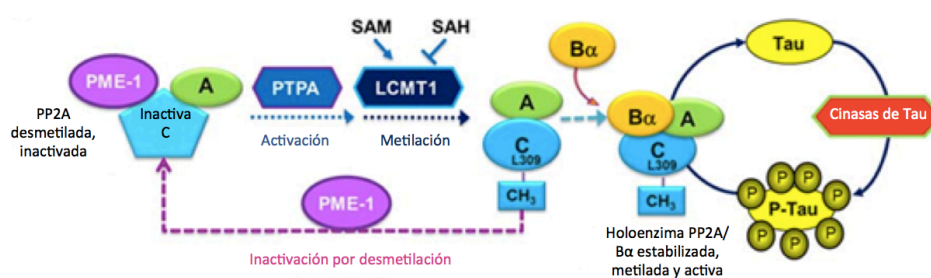


Figura 7. Mecanismos de regulación de PP2A. Modificada de Sontag y Sontag, 2014.

Los principales inhibidores endógenos específicos de PP2A son I_1^{PP2A} (también llamado ANP32a o PHAP-I), I_2^{PP2A} (también llamado SET, PHAP-II o TAFI β) y CIP2A (por sus siglas en inglés *oncprotein cancerous inhibitor of PP2A*). La expresión de CIP2A apenas es detectable en células normales pero sí tiene especial relevancia en tumorales, donde su sobreexpresión es indicadora de un mal pronóstico para el paciente [72]. I_1^{PP2A} e I_2^{PP2A} , que están altamente expresados en cerebro, ejercen su inhibición a través de su unión directa a la subunidad C, aunque se desconocen los aminoácidos con los que interaccionan. I_2^{PP2A} tiene una localización preferentemente nuclear, mientras que I_1^{PP2A} es citosólica, y ambos pueden ser

modificados por fosforilación o modificar su expresión en respuesta a estímulos celulares ^[72]. El ejemplo más destacado de esta regulación es el mediado por la cinasa Bcr-abl, presente en pacientes con leucemia mieloide crónica y positivos para el cromosoma Filadelfia. Esta cinasa es capaz de promover la inhibición de PP2A a través de la sobreexpresión y fosforilación del I_2^{PP2A} , lo cual conduce a la inmortalidad de las células leucémicas y es clave en el paso de leucemia mieloide en fase crónica a fase blástica ^[74]. Otros inhibidores endógenos, como CIP2A y $\alpha 4$, también pueden estar sobreexpresados en ciertos subtipos de cáncer, como por ejemplo el cáncer de colon y el hepático ^[72]. Ciertamente, PP2A se considera un importante supresor tumoral debido a su papel en el control del ciclo celular, por lo que es una de las dianas en terapia antineoplásica que más interés está despertando en los últimos años ^[75]. Reafirmando su papel antitumoral, se ha visto que mutaciones en las distintas subunidades de PP2A conllevan la disociación de la holoenzima y originan cánceres de ovario, pulmón o colon ^[72]. En todos estos tipos de cánceres, restaurar la actividad de PP2A es una estrategia prometedora.

Potencial indicación de las Ser/Thr fosfatasa para el tratamiento de la EA

Los altos niveles de expresión en cerebro de las dos isoformas de PP2Ac junto con la expresión específica de ciertas isoformas de la subunidad B/PR55 y B'/PR61 sugieren que PP2A es clave para una función neuronal normal ^[76]. Dentro de las neuronas, esta fosfatasa está especialmente asociada con los neurofilamentos, sobre los que regula su estado de fosforilación y así su estabilidad e interacción con otros miembros del citoesqueleto ^[76]. No obstante, el interés terapéutico sobre PP2A no radica en su papel sobre los neurofilamentos sino en la regulación que ejerce sobre el estado de fosforilación de la proteína asociada a microtúbulos tau. PP2A es la principal fosfatasa cerebral responsable de la desfosforilación de tau (> 70 %) ^[77]. Principalmente es la forma heterotrimérica con la subunidad reguladora $B\alpha$ la que colocaliza con los microtúbulos y tau, uniéndose a ambos por lugares diferentes y pudiendo servir como punto de anclaje entre los dos ^[78] ^[79]. Solo las subunidades $B\alpha$ y $B\beta$ (no $B\gamma$, $B\delta$, B' o B'') se asocian a microtúbulos y son capaces de desfosforilar a la proteína tau ^[80] ^[81]. Mediante un ensayo *in vitro* de desfosforilación y estudios de mutagénesis dirigida, Xu y col. dilucidaron los aminoácidos de contacto entre la subunidad B y la proteína tau ^[79]: dos fragmentos en la proteína tau ricos en aminoácidos lisina, y por tanto de naturaleza básica, interaccionan con un bolsillo de carácter ácido, rico en aminoácidos con carga positiva, presente en la subunidad $B\alpha$. El hecho de que haya dos secuencias de reconocimiento hace que la desfosforilación de tau llevada a cabo por PP2A sea mucho más eficiente, ya que ambas secuencias consiguen una mejor aproximación de la proteína tau al sitio catalítico de PP2Ac ^[79].

Desde que en 1986 Grundke-Iqbal y col. descubrieron que la proteína tau hiperfosforilada era el principal componente de los NFT ^[45], se han descubierto 30 residuos de Ser o Thr susceptibles de ser fosforilados ^[82]. Los aminoácidos claves para su disociación de los microtúbulos y autoagregación son Thr 231 y Ser 262, siendo también importantes Thr 181, Ser 199, Ser 202, Thr 212, Ser 396, Thr 403 y Ser 404 ^[83]. Las fosfatasa que actúan sobre la proteína tau son PP1, PP2A, calcineurina y PP5, las cuales en condiciones fisiológicas contribuyen a su desfosforilación en un 11, 71, 10 y 7 %, respectivamente (Figura 8) ^[77]. Por tanto, PP2A es la principal fosfatasa que actúa sobre tau, siendo capaz por sí sola de desfosforilar todos los aminoácidos críticos para su disociación y agregación. De hecho, de los 30 posibles residuos que tau puede tener fosforilados, todos pueden ser desfosforilados por PP2A, excepto Thr 212 y Ser 396 que son desfosforilados preferentemente por PP1 y calcineurina ^[83].

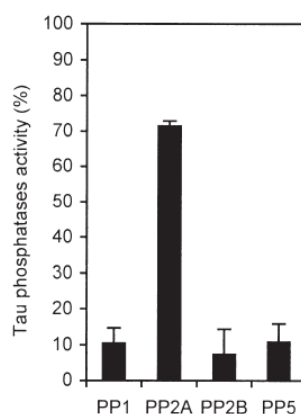


Figura 8. Contribución de PP1, PP2A, calcineurina y PP5 a la desfosforilación de la proteína tau. Tomada de Liu y col., 2005.

En los cerebros de pacientes con la EA, la hiperfosforilación de la proteína tau se debe, al menos en parte, a una disminución del 50 % de la actividad fosfatasa cerebral total, especialmente en áreas de la corteza y el hipocampo ^[84] ^[85]. Si se analiza la actividad de cada fosfatasa, PP2A se encuentra inhibida en un 50 % mientras que PP1 y PP5 en un 20 % ^[77], por lo que PP2A es la enzima más afectada. Esta disfunción de PP2A en pacientes con la EA ha sido ampliamente demostrada (Figura 9), describiéndose déficits en la expresión génica de su subunidad C, afectando a la síntesis del ARN mensajero ^[86], y de la proteína total ^[87]. También la expresión de la subunidad B α en la corteza frontal y la temporal está disminuida, lo que correlaciona muy bien con la patología tau en pacientes con la EA ^[87]. Así mismo, los mecanismos de regulación de PP2A están alterados. La metilación de PP2A se encuentra muy disminuida debido tanto a un aumento en la actividad de la enzima PME-1 como a la disminución de la actividad de LCMT-1, lo que produce la inactivación de PP2A y la pérdida de afinidad por la subunidad B α , responsable de la desfosforilación de tau ^[88]. Además, hay un aumento en la fosforilación del residuo Tyr 307 de PP2Ac, lo cual la inactiva igualmente ^[89].

Por último, en modelos de EA, existe un incremento del 20 % en la expresión de los inhibidores endógenos I_1^{PP2A} e I_2^{PP2A} , así como una traslocación de este último del núcleo al citosol [90].



Figura 9. Alteraciones de PP2A presentes en cerebros de pacientes con la EA. Modificada de Sontag y Sontag, 2014.

La inhibición *in vivo* de PP2A conduce a signos y síntomas que remedan la EA, incluidos los déficits cognitivos. La sobreexpresión de cualquiera de los inhibidores endógenos, I_1^{PP2A} o I_2^{PP2A} , así como el silenciamiento de la subunidad B α , conducen a la hiperfosforilación de la proteína tau, su disociación de los microtúbulos y la formación de los NFT, la pérdida de dendritas, alteraciones de los marcadores sinápticos y déficits en los test de comportamiento y de memoria espacial [91]. Así mismo, el inhibidor AO es una buena herramienta farmacológica para el estudio de la EA puesto que también reproduce dichas alteraciones [92].

No obstante, la inhibición de PP2A no solo conduce a una hiperfosforilación de la proteína tau por un descenso en su actividad fosfatasa, sino también por una regulación al alza de enzimas cinasas como GSK-3 β y cdk-5, las cuales aumentan su actividad si PP2A no es capaz de desfosforilarlas [93]. PP2A también regula el metabolismo de la APP a través de la desfosforilación de su residuo Thr 668, de manera que ante una disminución en la actividad de PP2A se favorece la producción de B β [88] [94]. A su vez, cinasas como GSK-3 β regulan la actividad enzimática de PP2A a través de la fosforilación en Tyr 307 [95], la inhibición de LCMT-1 y la activación de PME-1 [96], así como por la acumulación citosólica de I_2^{PP2A} [90].

Mención especial merece la interacción de PP2A y PP1 con el receptor de glutamato NMDA. Los receptores NMDA están formados básicamente por las subunidades NR1 y NR2, y en algunos casos por NR3. La subunidad NR3, que tiene un máximo de expresión durante el desarrollo embrionario pero que disminuye en la edad adulta, está constitutivamente asociada a PP2A. El papel de PP2A en este complejo proteico consiste en desfosforilar a Ser 897 de la subunidad NR1, disminuyendo así la entrada de Ca²⁺ a través del receptor [97]. En condiciones patológicas, como la EA, se produce una sobreactivación del receptor NMDA que provoca la

disociación de PP2A y una mayor permeabilidad de Ca^{2+} [97]. Por otra parte, PP1 regula la fosforilación de la subunidad NR2, lo que también limita la entrada de Ca^{2+} , reduciendo así la posible muerte por excitotoxicidad, a la vez que activa vías de neuroprotección [98].

Modulación farmacológica de PP2A

La hiperfosforilación de la proteína tau y su disociación de los microtúbulos son procesos reversibles, por lo que la reactivación de Ser/Thr fosfatasas tiene el potencial de convertirse en una diana terapéutica factible para el tratamiento de la EA, como así lo demuestran numerosas evidencias preclínicas [99]. Sin embargo, a diferencia de PP2A, no se conoce ningún compuesto que actúe sobre PP1 con indicación para la EA, presumiblemente por despertar menos interés terapéutico ya que PP1 solo es responsable de un 20 % de la actividad fosfatasa sobre tau. Por el contrario, más esfuerzos se han dirigido a desarrollar moduladores de la actividad de PP2A o compuestos con actividad dual sobre ambas fosfatasas.

Según Voronkov y col. [99], existen diferentes familias de activadores de PP2A, que pueden ser agrupados en tres estrategias:

- **Activación alostérica:**

Los primeros activadores de PP2A descritos fueron aminas básicas como protamina y polilisina (Figura 10), que se encuentran cargadas positivamente en pH fisiológico y son capaces de aumentar la actividad de PP2A mediante interacción con su subunidad C [100].

Las ceramidas (Figura 10) son el ejemplo clásico de activadores endógenos de PP2A, las cuales son segundos mensajeros de naturaleza lipídica generados por mecanismos dependientes de esfingomielinasa y que regulan el ciclo celular y la apoptosis. Las ceramidas pueden activar a PP2A por unión directa a su subunidad B, a través de la inhibición de su desmetilación o impidiendo la unión del inhibidor endógeno I_2^{PP2A} [101].

Recientemente, se ha visto que fenotiazinas como la perfenazina (Figura 10) son capaces de inducir la apoptosis de células T en leucemia mieloide aguda a través de una interacción directa con la subunidad A α [102].

- **Inhibición de una interacción inhibidora:**

El FTY720 (Fingolimod) (Figura 10) es un análogo sintético de esfingosina aprobado para el tratamiento de la esclerosis múltiple por su activación de receptores de esfingosina 1-fosfato. No obstante, también es un potente activador de PP2A capaz de unirse al mismo dominio en el que las ceramidas se unen a I_2^{PP2A} , provocando la disociación del inhibidor endógeno, así como su traslocación al núcleo [103]. Actualmente se están diseñando derivados de fingolimod carentes de actividad inmunosupresora (OSU-2S y S-FTY720,

Figura 10) ^[104]. Otra alternativa farmacológica propuesta son los péptidos COG112 y OP449, diseñados para interrumpir la unión entre PP2A y I_2^{PP2A} ^[75].

▪ Modulación de enzimas que regulan PP2A a nivel postraduccional:

Un ejemplo es la forskolina (Figura 10), que activa PP2A mediante la reducción de la fosforilación en Tyr307, por un mecanismo independiente de la activación de la adenilato ciclasa ^[105].

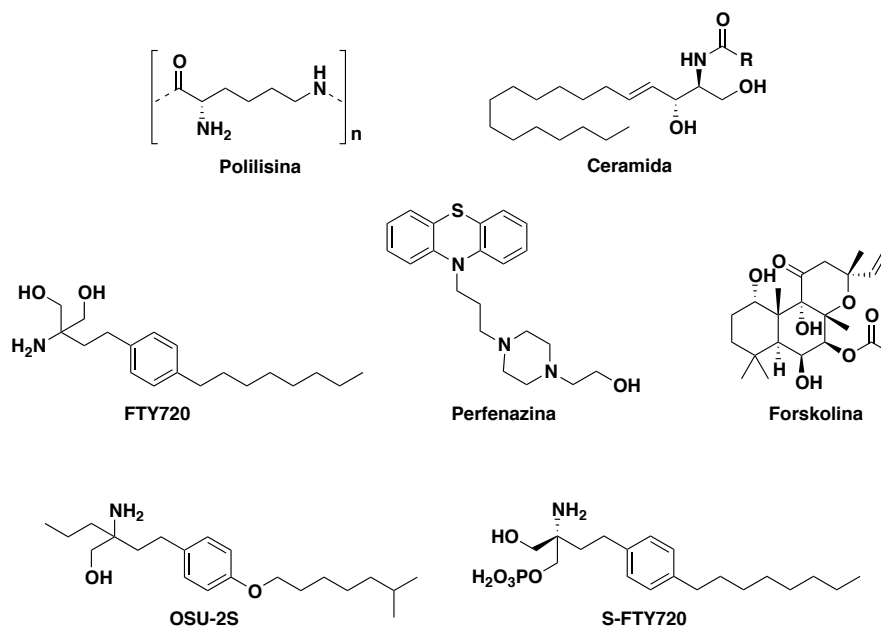


Figura 10. Estructuras de compuestos activadores de PP2A.

Neviani y col. fueron los primeros en defender el potencial interés terapéutico de fármacos activadores de PP2A, a los que llamaron PAD (por sus siglas en inglés *PP2A-activating drugs*). Demostraron cómo el uso de los activadores de PP2A fingolimod y forskolina tenía un efecto sinérgico con el inhibidor de cinasas imatinib para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda y crónica ^[103]. Actualmente, numerosas publicaciones defienden el uso de los PAD para el tratamiento del cáncer y de enfermedades neurodegenerativas como la EA. A continuación se exponen los ejemplos más relevantes con potencial indicación para la EA.

Stock y col. observaron que extractos de diferentes plantas del género *Coffea* mostraban una actividad inhibidora de la desmetilación de PP2A, lo que reafirmaría los estudios epidemiológicos que muestran una correlación negativa entre el consumo del café y la incidencia de la EA y la enfermedad de Parkinson ^[106]. Se determinó que el principal compuesto responsable de dicha actividad no era ni la cafeína ni ningún compuesto relacionado estructuralmente, sino el indol EHT (*N*-eicosanoilserotonina, Figura 11). Este compuesto es capaz de inhibir la desmetilación de Leu 309 mediante la formación de un complejo con PP2A que evita la interacción con PME-1, manteniendo así a la enzima en su forma activa.

Posiblemente ese complejo también impida la unión de inhibidores endógenos ^[107]. En un modelo *in vivo* de EA inducido por la sobreexpresión del I_2^{PP2A} , el compuesto EHT, administrado vía oral durante 6 meses, mantuvo la actividad fosfatasa de PP2A, revirtió la hiperfosforilación de tau, disminuyó la expresión de βA y condujo a una reducción de los déficits cognitivos ^[107].

La biguanida metformina (Figura 11) es capaz de prevenir la hiperfosforilación de tau inducida por el AO o la fostriecina, en cultivo primario de neuronas murinas. El mecanismo propuesto es la interferencia con las proteínas MID y $\alpha 4$, las cuales regulan la degradación de PP2Ac vía proteasoma ^[108].

En modelos *in vivo* de isquemia cerebral e *in vitro* de excitotoxicidad inducida por glutamato, la subunidad B/PR55 de PP2A se encuentra disminuida. Parece ser que uno de los mecanismos por los que la melatonina (Figura 11) ejerce un efecto neuroprotector en estos modelos es a través del mantenimiento de la actividad fosfatasa de PP2A, mediante la inhibición del descenso en la expresión de esta subunidad B ^[109].

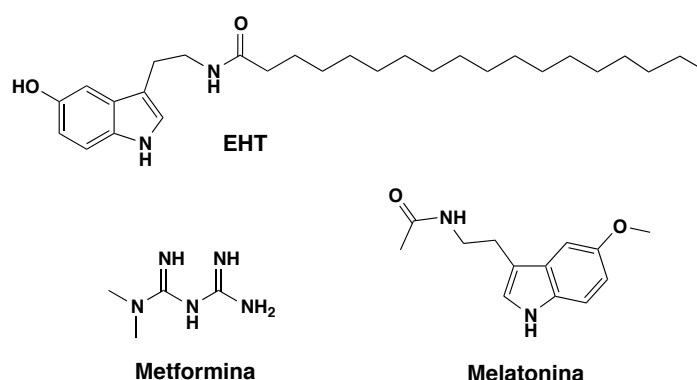


Figura 11. Estructuras de compuestos activadores de PP2A.

Varios artículos demuestran que la memantina también actúa como un activador de PP2A ^[99] ^[110]. En cultivo organotípico de rodajas de hipocampo de rata, tras la inducción de la hiperfosforilación de tau con AO, la memantina, pero no otros antagonistas del receptor NMDA (ácido 5,7-dicloroquinurénico o ácido D-2-amino-5-fosfopentanoico), es capaz de mantener la actividad fosfatasa de PP2A ^[111]. Posteriormente, en células PC-12 tratadas con AO, se demostró que el mecanismo implicaba un bloqueo de la interacción entre el I_2^{PP2A} y PP2A, posiblemente mediante la inhibición de la traslocación del I_2^{PP2A} del núcleo al citosol. De hecho, en ausencia del I_2^{PP2A} la memantina carece de efecto sobre PP2A ^[110]. También el fármaco donepezilo parece tener un efecto activador sobre PP2A, aunque el mecanismo es desconocido ^[112].

Por último, el ion selenato (SeO_4^{2-}) es un activador de PP2A potente y específico para heterotrímeros compuestos por la subunidad B/PR55, la responsable de la desfosforilación de la proteína tau, siendo su mecanismo de acción la estabilización del complejo PP2A/tau ^[113]. En varios modelos animales de la EA, se ha observado cómo dosis bajas de Na_2SeO_4 vía oral reducen la hiperfosforilación de la proteína tau, previenen la formación de los NFT y la consiguiente neurodegeneración y déficit cognitivo. Estos efectos son mediados por PP2A ya que el selenato no es capaz de reducir la hiperfosforilación de tau en ratones que coexpresan una subunidad B/PR55 defectuosa ^[114]. Recientemente, se ha completado el ensayo clínico fase IIa en el que se ha demostrado que la sal sódica es segura y bien tolerada en pacientes con la EA, por lo que parece prometedor ^[115].

2.2.4. Hipótesis de la desregulación del Ca^{2+} neuronal

El Ca^{2+} es un importante mediador de la señalización intracelular en neuronas, regulando funciones esenciales como la transcripción génica, el desarrollo neuronal, la modulación de la excitabilidad de membranas y la transmisión y plasticidad sinápticas ^[116]. La concentración de Ca^{2+} en el espacio extracelular (1-2 mM) es 10 000 veces superior a la que hay en el citosol (50-200 nM). Ante un estímulo, el Ca^{2+} entra desde el exterior a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV), receptores ionotrópicos, como por ejemplo los receptores de NMDA, o mediante la activación de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G que inducen la producción del segundo mensajero inositol-(1,4,5)-trifosfato (IP_3), el cual libera rápidamente Ca^{2+} desde los depósitos del retículo endoplasmático (RE) a través de los receptores de IP_3 . A su vez, la concentración de Ca^{2+} citosólica ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) activa los receptores de rianodina (RyR) del RE y regula el receptor de IP_3 , potenciando su apertura a bajas concentraciones e inhibiéndola a mayores. Este fenómeno se conoce como liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR, por su siglas en inglés: *calcium induced calcium release*). Por último, la depleción de los niveles de Ca^{2+} del lumen del RE activa los canales de Ca^{2+} capacitativos (SOC, por sus siglas en inglés) de la membrana plasmática. Estos canales SOC median la entrada de Ca^{2+} para repletar los depósitos intracelulares ^[117].

El gradiente de la concentración de Ca^{2+} se mantiene gracias a la bomba Ca^{2+} -ATPasa y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática, que expulsan Ca^{2+} al medio extracelular, así como a tres orgánulos intracelulares: el RE, el aparato de Golgi y la mitocondria. La bomba ATPasa del retículo sarco(endo)plasmático (SERCA, por sus siglas en inglés) introduce el Ca^{2+} del citosol al RE y este lo almacena unido a proteínas quelantes de Ca^{2+} de baja afinidad, entre las que destaca la calsecuestrina, y lo libera, como se ha mencionado anteriormente, por los

receptores de IP_3 y RyR. El aparato de Golgi almacena el Ca^{2+} a través de bombas Ca^{2+} -ATPasas y lo libera por receptores de IP_3 . A nivel mitocondrial, el Ca^{2+} es captado a través del uniportador y es liberado a través de los intercambiadores Na^+/Ca^{2+} y Ca^{2+}/H^+ [117]. Sin embargo, la mitocondria no actúa como un depósito intracelular de Ca^{2+} , sino que juega un papel mucho más fino en la regulación del Ca^{2+} . Es esencial para mantener las oscilaciones en la $[Ca^{2+}]_c$ que se producen durante la actividad sináptica, así como para adecuar la producción mitocondrial de energía en función de la actividad celular [118]. Además, es capaz de paliar de manera rápida y eficaz los aumentos excesivos en la $[Ca^{2+}]_c$, que de otra manera pueden llegar a alcanzar niveles citotóxicos [119].

Las señales de Ca^{2+} tienen que estar finamente reguladas en espacio, tiempo y magnitud. La alteración en la homeostasis del Ca^{2+} de manera sostenida, junto con la incapacidad de las neuronas para regularlo adecuadamente, son mecanismos etiopatogénicos presentes en muchas de las enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la EA. Esta hipótesis, propuesta por primera vez por Khachaturian en 1994 [120], intenta explicar desde las pérdidas de memoria incipientes hasta la neurodegeneración observada en estadios más avanzados de la enfermedad.

La $[Ca^{2+}]_c$ en neuronas y astrocitos de cerebros de pacientes con la EA se encuentra elevada, en especial en neuronas con NFT y en las proximidades a las placas de βA [121]. Un aumento sostenido en la $[Ca^{2+}]_c$ es capaz de conducir a la neurodegeneración por múltiples mecanismos. Por ejemplo, induce alteraciones en el citoesqueleto similares a las producidas por los NFT [122], así como cambios en el metabolismo de la APP, favoreciendo la producción de la isoforma de βA más tóxica (βA_{1-42}) y causando la hiperfosforilación de tau [123]. Como se ha mencionado anteriormente, el βA induce peroxidación lipídica de la membrana plasmática a través de la producción de ROS. Esta alteración en la membrana afecta al funcionamiento de la bomba Ca^{2+} -ATPasa, conduciendo a una elevación en la $[Ca^{2+}]_c$ basal y una mayor sobrecarga de Ca^{2+} citosólico al activarse los receptores de glutamato [124]. Por otro lado, los oligómeros de βA son capaces de formar poros selectivos para cationes en la membrana plasmática [36], así como, mediado por ROS, de aumentar la permeabilidad al Ca^{2+} de los receptores de NMDA y los CCDV [125]. Este aumento en la $[Ca^{2+}]_c$ no proviene únicamente del exterior celular, sino que los depósitos intracelulares también están involucrados. Por ejemplo, mutaciones en el gen PSEN-1 provocan una mayor liberación de Ca^{2+} desde el RE [126]. Por último, la calbindina, una de las principales proteínas quelantes de Ca^{2+} , está disminuida en pacientes con la EA, especialmente en el giro dentado del hipocampo [127]. Toda esta desregulación en la $[Ca^{2+}]_c$ conlleva la sobreexpresión de caspasas proapoptóticas, haciendo a las neuronas más vulnerables frente a un daño por excitotoxicidad. Además, paralelamente a este aumento en la $[Ca^{2+}]_c$, la mitocondria aumenta la concentración de Ca^{2+} en su interior y, si su habilidad para tamponarlo se ve

sobrepasada, perderá su potencial de membrana y la capacidad para sintetizar ATP, lo que conduce irremediabilmente a la apertura del poro de transición mitocondrial y la muerte por apoptosis ^[128].

La dishomeostasis del Ca^{2+} no solo conduce a neurodegeneración, sino que también afecta directamente a la memoria y al aprendizaje. Estos procesos están mediados por mecanismos de potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés) y depresión a largo plazo (LTD, por sus siglas en inglés) de los receptores AMPA, responsables de la transmisión excitatoria rápida. El LTP se desencadena por altos niveles en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ y es el responsable de la creación de nuevos recuerdos. Sin embargo, los oligómeros de βA secretados al medio extracelular inhiben este proceso ^[129]. El LTD es la fase de consolidación de la memoria y requiere de bajos niveles de Ca^{2+} , lo cual no ocurre en los cerebros de los pacientes con la EA ^[118].

2.2.4.1. Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV)

Como se ha mencionado previamente, una de las principales vías de entrada de Ca^{2+} en las células eléctricamente excitables son los CCDV. Estos canales fueron descubiertos por Fatt y Ginsborg en 1958 ^[130], gracias al registro de potenciales de acción en fibras musculares de cangrejo. Desde entonces, son muchos los subtipos de canales que se han identificado y caracterizado en diversos tipos celulares ^[131]. Farmacológicamente, los fármacos bloqueadores de CCDV del subtipo L constituyen un importante grupo terapéutico cuya principal indicación son las enfermedades cardiovasculares, en especial la angina y la hipertensión ^[132]. No obstante, el hecho de que estos canales también se encuentren en el sistema nervioso abre las puertas a nuevas indicaciones, como por ejemplo dolor, epilepsia, isquemia o enfermedades neurodegenerativas, aunque a pesar de las numerosas investigaciones en este campo todavía no se dispone de un grupo terapéutico adecuado ^[133]. La tabla 1 recoge los bloqueadores de CCDV que actualmente se encuentran en la clínica para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso ^[133].

Fármaco (compañía)	Dianas	Principales indicaciones	Posibles indicaciones	Estado
Isradipino (Dynaric; Reliant)	Canales tipo L	Hipertensión	Enfermedad de Parkinson y dependencia	Aprobada, Fase III ensayo para enfermedad de Parkinson
Nimodipino (Nimotop; Bayer)	Canales tipo L y tipo T	Hipertensión	Convulsiones febriles	Aprobada
Cilnidipino (Atelec/Cilacar; Fuji/Ajimoto)	Canales tipo L y tipo N	Hipertensión	Dolor y temblor	Aprobada
Gabapentina (Neurontin; Pfizer)	Cav α 2 δ subunidades	Dolor y epilepsia	Ansiedad	Aprobada

Pregabalina (Lyrica; Pfizer)	Cavα2δ subunidades	Dolor y epilepsia	Ansiedad	Aprobada
Lamotrigina (Lamictal; GlaxoSmithKline)	Canales tipo R	Epilepsia y trastorno bipolar	Dolor	Aprobada
Topiramato (Topamax; Mylan)	Canales tipo R	Epilepsia	Pérdida de peso y adicción	Aprobada
Zonisamida (Zonegran; Eisai)	Canales tipo T	Epilepsia	Dolor y enfermedad de Parkinson	Aprobada
Etoxisimida (Zarontin; Pfizer)	Canales tipo T	Epilepsia	Dolor	Aprobada
Ziconotida (Prialt; Elan)	Canales tipo N	Dolor	NA	Aprobada
Valproato (Depakene/Convulex; Abbott)	Canales tipo T	Epilepsia y manía bipolar	Enfermedad de Parkinson	Aprobada
Z944 (Epirus)	Canales tipo T	Dolor	Epilepsia	Fase II ensayo para el dolor
CNV2197944 (Convergence)	Canales tipo N	Dolor	Ansiedad y dependencia	Fase II ensayo para el dolor
Z160 (Epirus)	Canales tipo N	Dolor	Ansiedad y dependencia	Fracaso Fase II ensayo para el dolor

Tabla 1. Bloqueadores de CCDV para el tratamiento de enfermedades neurológicas. Modificada de G.W. Zamponi, 2016.

Subtipos de CCDV y su modulación farmacológica

Los CCDV son una familia de proteínas de membrana que, en respuesta a la despolarización de la membrana plasmática, cambian su conformación permitiendo la entrada de iones Ca^{2+} a favor de gradiente electroquímico. Son complejos multiproteicos formados por varias subunidades, en los cuales la subunidad α_1 constituye el poro del canal y las subunidades β , $\alpha_2\delta$ y γ son subunidades auxiliares y reguladoras. La subunidad α_1 (212-273 kDa) está organizada en cuatro repeticiones homólogas de 6 dominios transmembrana cada una. Los extremos C y N terminales son citoplasmáticos, así como los segmentos que conectan las distintas repeticiones, siendo aquí donde interaccionan las subunidades auxiliares, los moduladores farmacológicos, las proteínas G y donde se encuentran los aminoácidos susceptibles de ser regulados por fosforilación. Cada repetición contiene una región S4 que actúa como sensor de voltaje, un bucle P que proporciona selectividad al paso de iones y los segmentos S5-S6 que forman el poro del canal (Figura 12) ^{[131] [132]}.

Según su umbral de activación, los CCDV pueden ser clasificados en dos grupos: alto umbral de activación (CCDV tipo L, N, P/Q y R) y bajo umbral de activación (CCDV tipo T). Los primeros requieren grandes pulsos de despolarización para ser abiertos y los segundos requieren menores voltajes de despolarización ^[131]. Dentro de esta clasificación, a nivel estructural y funcional, encontramos las subfamilias que detallamos a continuación:

- **Ca_v1.1-1.4:** pertenecen a la familia de alto umbral de activación. Estos canales poseen las subunidades formadoras del poro α_{1S} , α_{1C} , α_{1D} o α_{1F} , y median corrientes tipo L (del inglés: *long lasting*), caracterizadas por una baja inactivación durante los pulsos despolarizantes. Este tipo de canales está presente en prácticamente todas las células excitables del organismo. Dentro del sistema nervioso central, tienen una localización preferentemente postsináptica. A nivel farmacológico, son muchos los compuestos orgánicos que actúan sobre ellos. Son sensibles a las 1,4-dihidropiridinas, bien sean activadoras (Bay K 8644) o bloqueadoras (nifedipino, nimodipino, isradipino o lacidipino) (Figura 13), los cuales actúan alostéricamente favoreciendo el estado del canal hacia una configuración abierta o cerrada, respectivamente. Las arilalquilaminas, como por ejemplo el verapamilo y la flunarizina, y las benzotiazepinas, como el diltiazem, bloquean el receptor a través de la oclusión del poro ^{[131] [132]}.
- **Ca_v2.1-2.3:** pertenecen a la familia de alto umbral de activación. Estos canales poseen las subunidades formadoras del poro α_{1A} (Ca_v2.1, corrientes tipo P/Q), α_{1B} (Ca_v2.2, corrientes tipo N) o α_{1E} (Ca_v2.3, corrientes tipo R). Los subtipos N y P/Q se expresan preferentemente a nivel del sistema nervioso central, en concreto a nivel presináptico mediando la liberación de neurotransmisores dependiente de Ca^{2+} ante la llegada de potenciales de acción ^[134]. Estos subtipos de canales son relativamente insensibles a dihidropiridinas, pero se bloquean selectivamente por toxinas peptídicas procedentes de arañas y caracoles marinos ^[135]. Por ejemplo, el subtipo N es bloqueado selectivamente por la ω -conotoxina GVIA mediante un bloqueo directo del poro. Los tipos P/Q se bloquean por la ω -agatoxina IVA. Los subtipos R se bloquean selectivamente por la toxina peptídica de origen sintético SNX-482. La ω -conotoxina MVIIC es capaz de bloquear todas las corrientes de CCDV tipo no L (Figura 13) ^[132].
- **Ca_v3.1-3.3:** pertenecen a la familia de bajo umbral de activación. Estos canales poseen subunidades formadoras del poro α_{1G} , α_{1H} o α_{1I} y median corrientes tipo T (del inglés: *tiny o transient*) caracterizadas por una rápida inactivación, que genera una corriente transitoria, y su inactivación a potenciales de -60 y -50 mV. Esta familia de canales de Ca^{2+} es insensible a todos los bloqueadores mencionados anteriormente, con la excepción de la fenilalquilamina flunarizina (Figura 13). El mibefradilo (Figura 13) es capaz de bloquearlos selectivamente, aunque también existen otros compuestos usados en la clínica capaces de bloquearlos de forma no selectiva, como el antiepiléptico etosuximida o el antipsicótico pimozida. Se pueden distinguir de otros canales porque son más sensibles al bloqueo por Ni^{2+} que por Cd^{2+} ^{[131] [132]}.

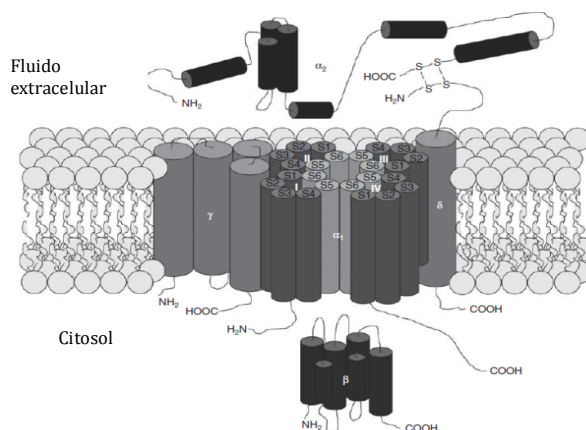


Figura 12. Estructura general de un canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje. Modificada de Arranz-Tagarro y col., 2014.

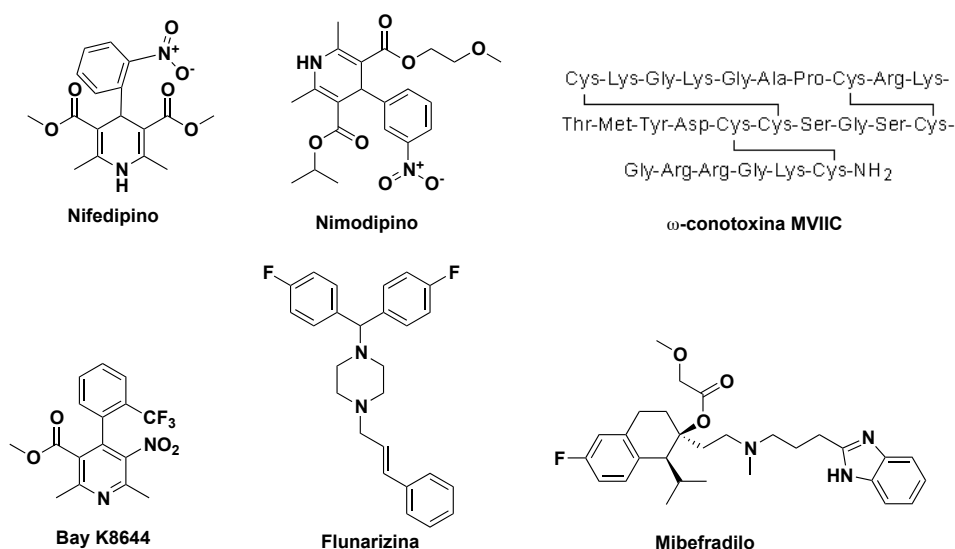


Figura 13. Estructuras de bloqueadores de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje.

Potencial indicación de los CCDV para la EA

Los antagonistas de CCDV son un interesante grupo terapéutico para el tratamiento de la EA dado que mejoran la perfusión cerebrovascular, mitigan la muerte por excitotoxicidad y muestran un efecto neuroprotector frente a la toxicidad inducida por βA . Tanto en la EA como en la demencia vascular existe una hipoperfusión cerebral que el uso de bloqueadores de CCDV puede prevenir mediante la relajación del músculo liso de la vasculatura cerebral^[134]. De hecho, el nimodipino se utiliza en la clínica para la prevención del vasoespasma en la hemorragia subaracnoidea^[134].

En cuanto a la neuroprotección frente a la excitotoxicidad, esto es debido a que la liberación de glutamato en el espacio sináptico a nivel central facilita la entrada de Ca^{2+} en las terminales postsinápticas a través de los receptores NMDA e indirectamente a través de canales CCDV tipo L ^[134]. Una excesiva liberación de glutamato conduce a una sobrecarga de Ca^{2+} postsináptica, desencadenando cascadas intracelulares que conducen a la muerte neuronal por excitotoxicidad. Un bloqueo de la entrada de Ca^{2+} a través de los CCDV en estas situaciones mitigaría la muerte celular. Además, conforme envejecemos, las neuronas son más susceptibles a este proceso de excitotoxicidad debido a dos procesos. Por un lado, la corriente que permea por los receptores NMDA es mayor, junto con una expresión incrementada de las subunidades NR2A y NR1. Por otro lado, existe un reclutamiento de CCDV tipo L hacia la membrana plasmática, los cuales contribuyen a agravar el proceso y aumentan la vulnerabilidad de las neuronas a esta muerte por excitotoxicidad ^[136].

Como se ha mencionado previamente, el βA aumenta la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ y modula los CCDV, a través de la generación de ROS ^[125]. Existe una gran controversia sobre si el βA afecta a canales CCDV tipo L o tipo no L. En células HEK293, que sobreexpresan diferentes subtipos de canales L, parece que el βA aumenta la corriente a través de las isoformas $\text{Ca}_v1.2$ y 1.3 ^[137]. Sin embargo, otros autores defienden que el βA media la liberación de neurotransmisores a través de los subtipos N y P/Q, sin alterar los canales tipo L ^[138], e incluso hay autores que defienden que el βA carece de selectividad afectando a todos los subtipos de CCDV ^[139]. En cualquier caso, el nimodipino, el verapamilo, el diltiazem y el isradipino previenen la neurodegeneración inducida por el βA en cultivos neuronales de manera dosis-dependiente, presumiblemente por un mecanismo de prevención del incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ inducido por el βA ^{[140] [141]}.

Numerosos antagonistas de CCDV han mostrado efectos neuroprotectores *in vivo*. El bloqueo de los canales tipo P/Q mediante la ω -agatoxina IVA resulta neuroprotector en modelos de isquemia en ratas ^[142]. El bloqueo selectivo de los canales tipo N con la toxina MVIIA conocida como ziconotida, utilizada en la clínica para el dolor crónico, es neuroprotector en modelos de traumatismo craneoencefálico ^[143]. La administración sistémica de verapamilo previene el déficit cognitivo en modelos de EA e isquemia cerebral ^{[144] [145]}, igualmente revierte la inhibición del LTP inducida por la inyección intracerebral de βA en ratas ^[146].

Estudios epidemiológicos sugieren que el uso de Ca^{2+} -antagonistas retrasa o previene la aparición y progresión de la EA, así como de la enfermedad de Parkinson y la isquemia cerebral ^{[147] [148] [134]}. A raíz de estas observaciones, varios antagonistas de CCDV han sido probados en ensayos clínicos de demencia, pero los resultados son heterogéneos, mostrando buenos resultados en unos y ningún efecto en otros. Dentro de los antagonistas de CCDV disponibles en

la clínica para el tratamiento de la hipertensión, se han utilizado para los ensayos clínicos aquellos capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y ejercer su efecto a nivel central, como el nimodipino, el nilvadipino y el nitrendipino ^[149]. La utilidad del nimodipino se examinó en una revisión Cochrane en la que analizaron 14 ensayos clínicos. Las conclusiones fueron que el nimodipino puede tener un efecto positivo en pacientes con la EA, pero carece de efecto en pacientes con demencia vascular ^[150]. En otros ensayos clínicos, el nitrendipino fue capaz de prevenir la aparición de demencia en pacientes hipertensos ^[151] y el nivaldipino mejoró el déficit cognitivo en pacientes con un deterioro leve ^[152].

Diversos autores defienden que las perspectivas futuras deberían ahondar en desarrollar compuestos con afinidad por el estado inactivado del canal y con mayor selectividad por canales de Ca^{2+} presinápticos, lo cual evitaría efectos sistémicos sobre la presión arterial ^[134]. En sinapsis hiperreactivas, los canales se encuentran preferentemente en estado inactivado, por lo que si los fármacos presentasen una mayor afinidad por este estado, en lugar de por el activado o cerrado, solo modularían la transmisión sináptica excesiva y carecerían de efecto en una transmisión sináptica normal (Figura 14) ^[134].

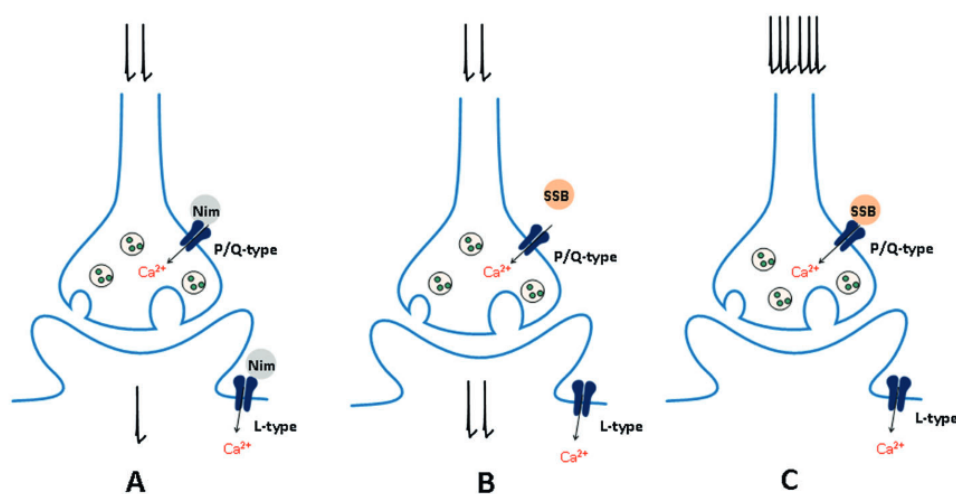


Figura 14. A) La unión inespecífica del nimodipino tanto a receptores presinápticos como postsinápticos produciría una disminución en la liberación de vesículas mediada por Ca^{2+} , así como un descenso en el potencial excitatorio postsináptico y la subsiguiente disminución en la neurotransmisión. B y C) Con un bloqueador de CCDV tipo no L que tuviese preferencia por el estado inactivado del canal, podría darse una transmisión sináptica normal. Solo en casos de una actividad neuronal excesiva, donde muchos canales de Ca^{2+} se encuentran en estado inactivado, la transmisión sináptica se encontraría impedida. Tomada de Nimmrich y Eckert, 2013.

Aunque existen evidencias preclínicas y clínicas que demuestran que el bloqueo de CCDV puede atenuar la demencia, la eficacia en los ensayos clínicos no justifica el uso de los

antagonistas de CCDV estudiados hasta el momento para el tratamiento de la EA. Por esto, es necesario el desarrollo de nuevos antagonistas de CCDV con potencial indicación para el sistema nervioso central. Uno de los retos en el diseño y desarrollo de este tipo de compuestos es la alta homología en la secuencia peptídica entre los diferentes tipos de CCDV, así como cierta similitud estructural con otros canales iónicos dependientes de voltaje ^[133]. Se dispone de fármacos selectivos para el bloqueo de canales tipo L (nisoldipino, felodipino o isradipina), antagonistas de CCDV de amplio espectro que bloquean todos los subtipos de canales (como los derivados de piperazina, cinarizina o flunarizina) y algunos compuestos que bloquean canales CCDV no L de manera no específica (gabapentina). Para el bloqueo selectivo de CCVD no L solo existen toxinas peptídicas, como por ejemplo la ziconotida, y no existe ninguna molécula orgánica de bajo peso molecular capaz de modular selectivamente corrientes tipo P/Q o N en la clínica. Así, son numerosas las investigaciones que tratan de desarrollar este tipo de compuestos con potencial indicación en la enfermedad de Parkinson (antagonistas tipo L), dolor neuropático (antagonistas tipo N y P/Q), epilepsia y ataxia (antagonistas tipo N) o EA (antagonistas no L) ^[153] ^[132]. Un ejemplo de bloqueador no L de naturaleza no peptídica es el compuesto A-1048400 (Figura 15), capaz de bloquear canales presinápticos sin presentar actividad sobre los canales tipo L, además de mostrar preferencia por el estado inactivado del canal y un buen paso de barrera hematoencefálica. Este compuesto presenta actividad antinociceptiva en modelos de dolor neuropático e inflamatorio ^[154]. El compuesto ST101 (Figura 15), patentado por Weber y col. (2012), es un antagonista selectivo de Ca_v3.1 que, además de bloquear las corrientes tipo T, inhibe la acumulación de β A y mejora la función cognitiva en modelos animales de EA ^[155].

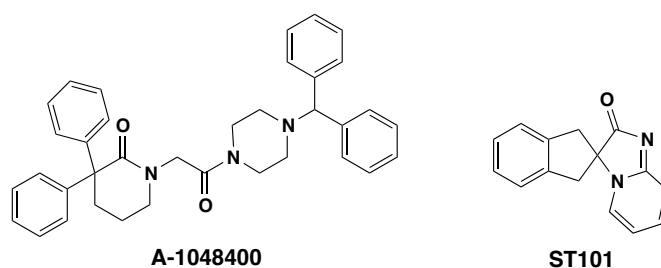


Figura 15. Estructuras químicas de antagonistas de CCDV no L.

2.2.5. Otras causas: disfunción mitocondrial, estrés oxidativo y neuroinflamación

Tanto la disfunción mitocondrial como el estrés oxidativo se encuentran presentes en numerosas enfermedades neurodegenerativas como eventos muy tempranos, concretamente en la EA preceden a la aparición de placas de β A y NFT ^[156]. El aporte energético de las neuronas depende, casi exclusivamente, de la glucólisis y la fosforilación oxidativa mitocondrial. Esto hace a las neuronas especialmente vulnerables frente a una disfunción mitocondrial, puesto que

no serían capaces de sintetizar ATP ^[128]. En los cerebros *postmortem* de los pacientes con la EA se ha observado una considerable disminución en la función de las enzimas implicadas en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y de la cadena respiratoria mitocondrial ^[157]. La morfología y distribución de la mitocondrias a lo largo del soma y del axón de las neuronas también están alteradas, seguramente debido a una acción moduladora del β A sobre las proteínas que modulan la fisión y fusión mitocondrial, así como por las alteraciones del citoesqueleto debidas a la presencia de la proteína tau hiperfosforilada ^[158]. El β A es un potente tóxico mitocondrial ya que inhibe directamente a varias de estas enzimas, como por ejemplo la citocromo *c* oxidasa ^[159] y la alcohol deshidrogenasa ^[160].

Como se ha mencionado previamente, el β A es un potente generador de ROS y NOS ^[32] ^[33]. La isoforma βA_{1-40} incrementa significativamente la producción de H_2O_2 mitocondrial, la cual difunde al citosol. Entre las alteraciones presentes en la EA, también existe una dishomeostasis de los metales de transición hierro, cobre, cinc y aluminio, los cuales se acumulan dentro de las neuronas y contribuyen a la generación de estrés oxidativo. El β A es capaz de reducir el Cu^{2+} a Cu^+ y el Fe^{3+} a Fe^{2+} para así generar ROS a través de la reacción de Fenton (Figura 16) ^[161]. Estos metales de transición también contribuyen a la fosforilación y la agregación de la proteína tau ^[161].

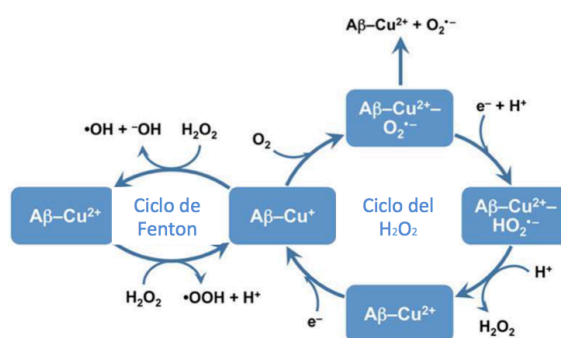


Figura 16. Reacción de Fenton modulada por la presencia de β A. Modificada de Savelieff y col., 2013.

Las mitocondrias contienen muchas enzimas antioxidantes debido a que, inherente a la fosforilación oxidativa y aun siendo un proceso fisiológico, se producen ROS: H_2O_2 , radical hidroxilo ($\cdot OH$) y radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$). De hecho, hasta un 90 % de las ROS en las células son de origen mitocondrial ^[162]. Cuando la producción de ROS supera la capacidad antioxidante de la célula se produce el estrés oxidativo, donde las ROS no neutralizadas quedan libres para reaccionar con los lípidos de membrana, las proteínas y el ADN mitocondrial, el cual es especialmente vulnerable al carecer de histonas que lo reparen ^[157]. Como se ha mencionado anteriormente, el aumento de la $[Ca^{2+}]_c$ provoca una activación de la cadena respiratoria mitocondrial, derivando en una sobreproducción de ROS. Si la cadena respiratoria mitocondrial

está inhibida, por ejemplo por acción del βA , los electrones se acumulan en el complejo I y la coenzima Q, los cuales los pueden donar directamente al oxígeno molecular, dando lugar a $O_2^{\bullet-}$, exacerbando el estrés oxidativo. En resumen, ante una disfunción mitocondrial, se pierde la correcta actividad de la cadena transportadora de electrones, no produciéndose ATP ni consumiéndose oxígeno, se aumenta la producción de $O_2^{\bullet-}$ y se genera estrés oxidativo. Todo esto conduce a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, la liberación del citocromo c y la apoptosis ^[128]. También el βA , por sí mismo, potencia la apertura del poro de transición mitocondrial ^[35].

Como último mecanismo patológico a destacar, es necesario mencionar la neuroinflamación ya que la patogenia en la EA no es exclusivamente neuronal y la glía también juega un importante papel. En los cerebros de los pacientes con la EA, los marcadores bioquímicos correspondientes a una microglía activada y astrocitos reactivos se encuentran aumentados, en especial en los alrededores de las placas de βA ^[163]. Inicialmente, la microglía fagocítica degrada el βA del espacio extracelular. Sin embargo, su activación crónica conduce a un fenotipo proinflamatorio con la liberación de citocinas, entre las que destacan la interleucina 1, la interleucina 6 y el factor de necrosis tumoral α , dando lugar a una cascada inflamatoria que favorece la progresión de la neurodegeneración. Además, estas citocinas también provocan una migración de monocitos desde la sangre periférica, lo que, junto con el estrés oxidativo, compromete la integridad de la barrera hematoencefálica ^[163].

2.3. Tratamiento actual de la EA

No existe actualmente un tratamiento farmacológico curativo de la enfermedad. Sí hay, en cambio, tratamientos que aminoran la velocidad de su progresión si el estadio es aún temprano. El primer fármaco aprobado para la EA, en 1993, fue la tacrina, un inhibidor de enzimas colinesterasas, retirada del mercado en el año 2013 por su hepatotoxicidad ^[17]. Actualmente, son cuatro los medicamentos aprobados para su tratamiento: los inhibidores de acetilcolinesterasa donepezilo, rivastigmina y galantamina, y el antagonista del receptor NMDA memantina (Figura 17). Los inhibidores de acetilcolinesterasa tienden a estabilizar la función cognitiva y la capacidad de desempeñar las funciones cotidianas durante el primer año de tratamiento, en los casos de EA leve a moderada. En los casos moderados o graves, la memantina en monoterapia o como coadyuvante a los anticolinesterásicos tiene un cierto efecto paliativo del deterioro cognitivo ^[17].

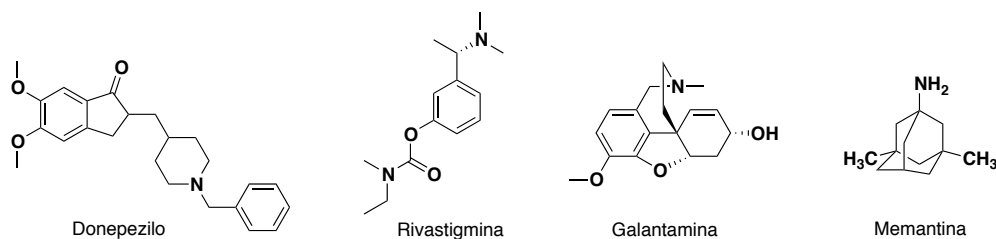


Figura 17. Estructuras de los tratamientos farmacológicos disponibles para la EA.

Desde el año 2003 en el que se incorporó la memantina, ningún otro fármaco ha sido aprobado para la EA. Aunque existe una urgente necesidad de posicionar nuevos tratamientos, son muchas las dificultades que se presentan para poder desarrollarlos, como por ejemplo la falta de modelos animales válidos y de buenos biomarcadores que muestren la evolución de la enfermedad, la elección de la población diana en los ensayos clínicos, la dificultad para demostrar mejoras en la capacidad cognitiva en los ensayos clínicos, etc ^[164]. Durante las últimas dos décadas, los investigadores se han centrado en la patología amiloide, incluyendo estrategias basadas en terapias con anticuerpos monoclonales (bapineuzumab, solanezumab, gantenerumab), inhibidores de γ -secretasa (avagacestat) y β -secretasa o fármacos antiagregantes. Aunque en los ensayos clínicos parece ser que la carga de β A disminuye, los resultados en la capacidad cognitiva son desalentadores ^[165]. Actualmente, el desarrollo clínico se está diversificando y también se están estudiando fármacos dirigidos a la patología tau o al estrés oxidativo, entre otras.

3. ESTRATEGIA MULTIDIANA PARA EL DISEÑO DE FÁRMACOS

3.1. Justificación

Patologías como las enfermedades neurodegenerativas, el cáncer o la artritis reumatoide tienen como factor común la falta de un tratamiento eficaz debido a su compleja etiopatogenia. Por una simple mutación no se desarrolla un cáncer, ni la muerte de una sola neurona desencadena la EA. Este tipo de enfermedades son multifactoriales, con muchos genes implicados, muchas cascadas de señalización afectadas y diferentes tipos celulares involucrados ^[166]. Las funciones celulares están construidas con un alto grado de redundancia, lo que les confiere una gran habilidad intrínseca para mantener la homeostasis. Para modular el fenotipo de un proceso patológico de estas características es necesario alterar el funcionamiento de varios de sus componentes, puesto que la modificación de una sola diana no es suficiente debido a la existencia de mecanismos compensatorios ^[166].

Cuanto mayor es la complejidad de la enfermedad, mayor es el reto en el desarrollo de fármacos

para su tratamiento. En otras palabras, un fármaco simple difícilmente va a conseguir tratar una enfermedad compleja. Por esto, un abordaje multidiana es una estrategia que conlleva mayor probabilidad de éxito que la de dirigirse a una única diana para este tipo de patologías. De acuerdo con Csermely y col.^[167], la inhibición parcial de múltiples dianas es más efectiva que la inhibición completa de una sola. Los fármacos multidiana buscan alterar las redes de señalización patológicas, no una sola proteína o un solo gen. Para ello, pueden atacar una misma diana por dos mecanismos diferentes, actuar sobre dos dianas diferentes dentro de la misma vía o actuar sobre dos vías distintas dentro del mismo proceso patológico. Además, si las dianas son complementarias puede haber una interacción sinérgica^{[166] [168]}.

En la clínica, la combinación de medicamentos o polifarmacología es una práctica bien establecida puesto que estas asociaciones mejoran la efectividad de los tratamientos o evitan el desarrollo de resistencias. Sin embargo, tienen la gran limitación de la toxicidad, puesto que derivan en un mayor riesgo de efectos adversos, interacciones farmacocinéticas o interacciones fármaco-fármaco. Un compuesto multidiana diseñado racionalmente puede ofrecer un mejor ratio eficacia/seguridad. Además, al actuar sobre varias dianas proporcionaría un efecto sinérgico o aditivo, mejorando la eficacia del fármaco. Todo esto permitiría disminuir la dosis, los efectos secundarios asociados serían menores y existiría una ventana terapéutica mayor. De cara a su utilización en la práctica clínica, el uso de un solo fármaco multidiana mejora la adherencia al tratamiento y disminuye la probabilidad de desarrollo de mecanismos compensatorios o resistencias^[169].

3.2. Ejemplos de fármacos multidiana para la EA

En la comunidad científica dedicada a la investigación y desarrollo (I+D) de fármacos para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, existe una creciente opinión que argumenta que la estrategia tradicional de diseño de compuestos dirigidos hacia una única diana tiene pocas perspectivas de éxito, teniendo en cuenta el carácter multifactorial de estas enfermedades. La tendencia actual en el diseño de fármacos para estas enfermedades se ha inclinado hacia el desarrollo de ligandos multidiana, como confirma el estudio de mercado llevado a cabo por Lu y col.^[170] en el que discuten que aproximaciones como el *high-throughput screening* y el desarrollo de fármacos muy potentes y selectivos contra una sola diana tienen menor potencial. Centrándonos en neuroprotección, una sola diana parece no ser suficiente para prevenir el avance de la muerte celular, posiblemente debido a la existencia de mecanismos compensatorios que quedan fuera del ámbito de influencia del compuesto, de ahí que el diseño de un ligando multidiana podría ser beneficioso^[168]. Son muchas las revisiones bibliográficas

[171] [172, 173] que discuten las estrategias multidiana publicadas con indicación para la EA. Existen algunos ejemplos paradigmáticos que perfilan las generalidades de los frutos esperables de estas estrategias.

El ladostigil (TV-3326) (Figura 18) es un ligando multidiana desarrollado por el grupo de M. B. Youdim en el año 2012 [174] que mostró una tendencia positiva en retrasar o prevenir la aparición de la EA en un ensayo clínico fase II (NCT01354691). Actualmente se encuentra en ensayo clínico fase IIB para el tratamiento de demencia cognitiva leve (NCT01429623). El ladostigil fue diseñado para aunar en su estructura la rivastigmina (inhibidor de la acetilcolinesterasa, utilizado en la clínica para la EA) y la rasagilina (inhibidor selectivo de la enzima monoamino oxidasa tipo B o MAO-B, utilizado en la clínica para la enfermedad de Parkinson). Gracias a esta estructura híbrida, ladostigil posee la capacidad de inhibir ambas colinesterasas (acetilcolinesterasa y butilcolinesterasa) así como las MAO-A y MAO-B. También mostró propiedades neuroprotectoras adicionales, como la disminución del procesamiento proteolítico de la APP, la estabilización del potencial de membrana mitocondrial o capacidad antioxidante [174].

Del mismo modo, el grupo de M. B. Youdim, en 2012, desarrolló otro compuesto multidiana llamado M30, partiendo del motivo estructural propargilo de la rasagilina (Figura 18). En este caso, la combinación del inhibidor de la MAO-B rasagilina y del quelante de metales y antioxidante VK28 dio lugar a este fármaco, que ofrece un interesante perfil neuroprotector con propiedades antioxidantes, secuestrador de hierro, regulador del metabolismo de β A e inductor de neurogénesis [175].

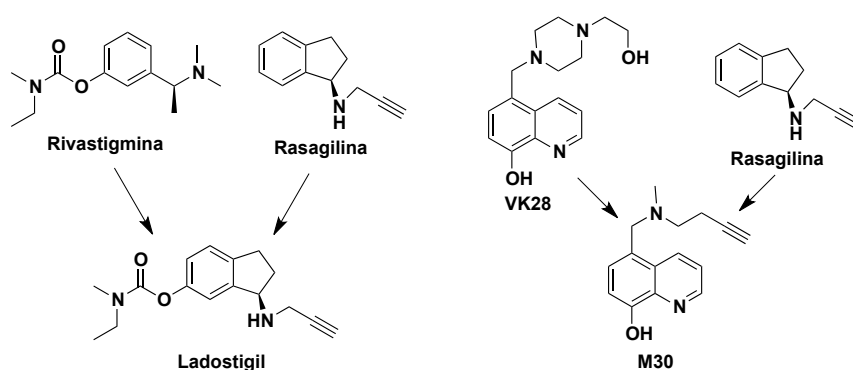


Figura 18. Estructuras químicas de los ligandos multidiana ladostigil y M30.

Como se ha mencionado anteriormente, la tacrina fue el primer tratamiento aprobado para la EA, pero tuvo que ser retirado debido a su hepatotoxicidad inducida por ROS. Por este motivo, muchos grupos de investigación han diseñado análogos de tacrina con motivos estructurales

antioxidantes, como la cafeína, el ácido ferúlico o la melatonina. Por citar un ejemplo, la yuxtaposición de tacrina y 8-hidroxiquinolina dio lugar a un compuesto con efecto anticolinesterásico, antioxidante, quelante de cobre y neuroprotector (Figura 19) ^[176]. Con todo, los derivados de tacrina descritos con propiedades multidiana son muchísimos, combinando la inhibición de colinesterasas con otras propiedades neuroprotectoras: antiagregantes de β A, secuestradores de metales, antiinflamatorios, inhibidores de la fosforilación de la proteína tau o inhibidores de las enzimas MAO ^[172].

Otra familia prolífica de fármacos multidiana para la EA son aquellos que presentan una estructura híbrida con donepezilo, añadiéndose a la inhibición de colinesterasas propiedades como el agonismo serotoninérgico, la antiagregación de β A, la capacidad antioxidante o la inhibición de enzimas MAO ^[172] ^[177]. Un ejemplo representativo es el compuesto ASS234 (Figura 19), híbrido de donepezilo y propargilamina, que es un potente inhibidor de colinesterasas y MAO, antioxidante y antiagregante de β A. Mostró resultados positivos en modelos *in vivo* de demencia vascular, así como disminuyó las placas de β A y la activación glial en un modelo APP/PS1AE. Además, ha dado lugar a interesantes derivados con propiedades mejoradas ^[177].

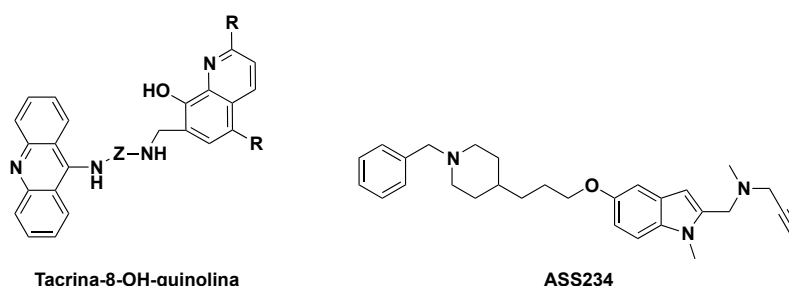


Figura 19. Estructuras químicas de ligandos multidiana basados en tacrina y donepezilo.

El ligando multidiana ITH33/IQM9.21 (Figura 20) fue diseñado con una original estructura derivada del ácido L-glutámico, ofreciendo propiedades claves para el control de la dishomeostasis del Ca^{2+} y la neuroprotección, como por ejemplo la inhibición moderada de acetilcolinesterasa, buenas propiedades antioxidantes e inhibidor de CCDV ^[178] ^[179]. El compuesto ITH12410 (Figura 20), fruto de un *high-throughput screening*, también mostró un perfil multidiana ofreciendo protección frente a diferentes estímulos relacionados con la hiperfosforilación de la proteína tau, la toxicidad por β A y el estrés oxidativo ^[180].

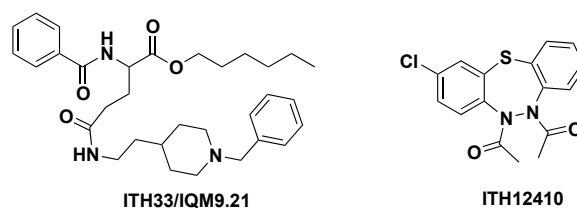


Figura 20. Estructuras químicas de los ligandos multidiana ITH33/IQM9.21 e ITH12410.

Por último, mencionar que algunos ligandos multidiana se han obtenido a partir de productos naturales como la curcumina o la berberina. Jiang y col. (2011) utilizaron una combinación de esta última (inhibidor de colinesterasas) con estructuras con capacidad antioxidante, dando lugar a compuestos con excelentes propiedades antioxidantes e inhibidores de acetilcolinesteras, además de inhibidores de la agregación de β A como propiedad adicional (Figura 21) ^[181]. Recientemente, Di Martino y col. (2016) han sintetizado una serie de análogos de curcumina (Figura 21) como inhibidores duales de las enzimas BACE-1 y GSK-3 β , atacando así tanto a la cascada amiloide como a la fosforilación de la proteína tau ^[182].

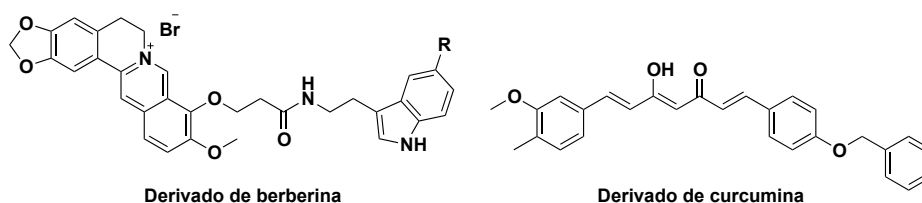


Figura 21. Estructuras químicas de derivados de berberina y curcumina multidiana.

V. HIPÓTESIS DE TRABAJO

V. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Dada la naturaleza multifactorial de la enfermedad de Alzheimer, existe una visión cada vez más extendida que postula que compuestos que actúen sobre dos o más dianas implicadas en el proceso neurodegenerativo serían capaces de ser más efectivos para su tratamiento. Entre las posibles dianas de intervención, son numerosas las evidencias que muestran una alteración en la homeostasis del Ca^{2+} así como en la actividad Ser/Thr fosfatasa.

Esta Memoria de Tesis se plantea como hipótesis de trabajo una nueva estrategia, no explorada hasta la fecha, para el descubrimiento de fármacos enfocados al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer basada en el abordaje simultáneo de la homeostasis del Ca^{2+} y la actividad Ser/Thr fosfatasa.

Es importante mencionar que, aunque cada una de estas dianas farmacológicas está siendo estudiada de manera individual, nuestro grupo de investigación es el primero en proponer la intervención farmacológica sobre ambas como estrategia multidiana para un posible tratamiento eficaz para la enfermedad de Alzheimer.

VI. OBJETIVOS

VI. OBJETIVOS

Para responder a esta hipótesis de trabajo, el objetivo fundamental de esta Memoria de Tesis es el desarrollo de ligandos multidiana capaces de actuar simultáneamente sobre canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y enzimas Ser/Thr fosfatasa. Con este fin, se plantearon los siguientes objetivos concretos:

1. *Búsqueda de un nuevo compuesto activo o hit.* Estudio de las propiedades farmacológicas de la gramina sobre los CCDV y la actividad Ser/Thr fosfatasa, así como su perfil neuroprotector.
2. *Diseño y Síntesis de nuevos derivados de gramina.* Partiendo de la gramina como estructura base, propuesta de sustituciones basadas en estudios de anclaje o *docking* molecular y de la información disponible en la literatura. Síntesis orgánica y caracterización estructural de un conjunto representativo de derivados de gramina que permita explorar su potencial indicación en la EA.
3. *Estudio farmacológico de los derivados de gramina.* Antagonismo sobre los CCDV y mantenimiento de la actividad fosfatasa.
4. *Evaluación del perfil neuroprotector* de los derivados de gramina en distintos modelos de neurodegeneración relacionados con la EA.
5. *Evaluación del perfil neuroprotector* de los derivados de gramina en distintos modelos de neurodegeneración relacionados con la EA.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES Y MÉTODOS DE SÍNTESIS QUÍMICA, CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y ESTUDIO COMPUTACIONAL

A continuación, se describen los protocolos y materiales empleados a lo largo de esta Memoria de Tesis relacionados con la química médica.

1.1. Materiales utilizados

La gramina (**1**), la *N,N*-dimetil-1-(5-metil-1*H*-indol-3-il)metanamina (**15**), el 1*H*-indol, el 5-bromo-1*H*-indol, el 5-metil-1*H*-indol, el 5-cloro-1*H*-indol y los reactivos necesarios para la síntesis química fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Madrid, España). El 5-bromo-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridina se obtuvo de Fluorochem (Hadfield, UK).

Los disolventes, con calidad analítica, utilizados en las reacciones, extracciones y cromatografías fueron suministrados por Carlo Erba (Barcelona, España) y VWR (Barcelona, España). En el caso de los disolventes clorados utilizados para extracciones y purificaciones de productos finales, se utilizaron tras pasarlos por columna de alúmina básica, con el objeto de neutralizar las trazas de ácido que pudiesen contener. Los disolventes deuterados utilizados para resonancia magnética nuclear (RMN) se adquirieron en VWR (Barcelona, España).

Todas las reacciones descritas en esta Memoria se llevaron a cabo bajo las condiciones de Schlenk^[183], es decir, sistemas previamente flameados a vacío y purgados de posibles trazas de aire y humedad con ciclos de vacío/gas inerte. Las reacciones se llevaron a cabo en atmósfera inerte.

El seguimiento de las reacciones se efectuó por cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés), utilizando como fase estacionaria sílica gel (Fluka Analytical, Alemania) u óxido de aluminio (Sigma-Aldrich, Madrid, España), ambas con un tamaño de poro de 60 Å. La detección de productos se realizó con luz UV a 254 nm.

Los productos intermedios se purificaron por cromatografía en columna flash automatizada en un equipo Isolera One (Biotage, Madrid, España), con columnas de sílica precargadas SNAP o ZIP, del mismo fabricante. Los productos finales se purificaron por cromatografía en columna flash sobre fase estacionaria de alúmina básica (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Ninguno de los derivados descritos en esta Memoria presentó similitudes estructurales con los denominados *Pan Assay Interference Compounds* (PAINS), de acuerdo con la clasificación publicada por Baell y Holloway^[184].

1.2. Métodos de caracterización estructural y determinación de la pureza de los compuestos

1.2.1. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C se adquirieron en un espectrómetro Bruker Avance 300. El disolvente deuterado empleado se especifica en cada caracterización. Los valores de los desplazamientos químicos (δ) se describen en partes por millón (ppm), referenciándolos internamente mediante la señal traza de ^1H que presenta el disolvente deuterado. Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hz. Las asignaciones de las señales de RMN de ^1H se realizaron en base a los desplazamientos químicos, el valor de la integración de las señales, su multiplicidad y el valor de las constantes de acoplamiento.

Estos análisis se realizaron por nuestro grupo en el autoservicio de la Unidad de Espectroscopía Molecular, Laboratorio Jesús H. Rodríguez Ramos, Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear de Líquidos del Servicio Interdepartamental de Investigación (SIdI) de la Universidad Autónoma de Madrid. La generación de los espectros obtenidos se realizó mediante el programa MestReNova 10.0 (Mestrelab Research; Santiago, España).

1.2.2. Espectrometría de Masas Molecular

Los espectros de masas de alta resolución se realizaron por la técnica de Electrospray en modo positivo, con un espectrómetro VG AutoSpec Waters en un QSTAR (Applied Biosystems). Los datos obtenidos se expresan en unidades de relación masa/carga (m/z). Estos análisis se realizaron en la Unidad de Espectrometría de Masas, Laboratorio de Espectrometría de Masas del SIdI de la Universidad Autónoma de Madrid.

1.2.3. Puntos de fusión (Pf)

Los puntos de fusión se midieron en un aparato Melting Point modelo SMP10 de Stuart y están sin corregir.

1.2.4. Análisis químico elemental

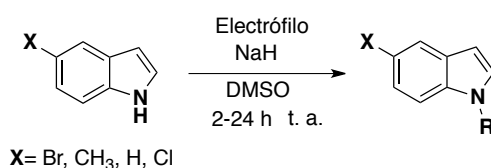
Todos los compuestos descritos y evaluados farmacológicamente presentan una pureza del 95% o mayor, determinada por análisis químico elemental realizado en un analizador LECO CHNS-932. La diferencia entre los valores de C, H y N, calculados y experimentales, es menor del 0,4%. Estos análisis se realizaron en la Unidad de Análisis Químico Elemental del SIdI, de la Universidad Autónoma de Madrid.

1.2.5. Cristalografía de rayos X

La realización de la difracción de rayos X para el establecimiento de la estructura tridimensional de los compuestos requiere de la obtención previa de su estructura cristalina. Para ello, el derivado **2** se disolvió en acetona por calentamiento a 56 °C, recogiendo cristales por evaporación lenta del disolvente a temperatura ambiente (t. a.). El oxalato del derivado **14** se disolvió en metanol por calentamiento a 68 °C, obteniéndose los cristales de la misma manera que el anterior. Los datos de difracción de rayos X se obtuvieron en un difractómetro Bruker Kappa Apex II. Estos análisis se realizaron en la Unidad de Rayos X, Laboratorio de Difracción de Rayos X del SIDI de la Universidad Autónoma de Madrid.

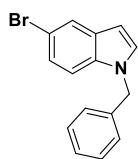
1.3. Síntesis química de derivados de gramina

1.3.1. Procedimiento general I para la N-alkilación de 5-bromo-1H-indol (**a**), 5-metil-1H-indol (**b**), 1H-indol (**c**) y 5-cloro-1H-indol (**d**)



Se siguió el procedimiento descrito por Na y col.^[185] con ligeras modificaciones. A una solución de **a**, **b**, **c** o **d** (1 equiv) en dimetilsulfóxido (DMSO) (1,4–5 ml/mmol) se adicionó NaH (60 % en aceite mineral, 1,2 equiv) bajo argón. La mezcla de reacción se mantuvo a t.a. con agitación, durante 1–2 h, tras lo cual se añadió el correspondiente haluro de alquilo (1,2–1,7 equiv), dejándose en agitación 1–2 h más (a excepción de **a4** que se dejó 24 h), siguiendo la evolución de la reacción por TLC. Cuando la reacción se completó o no evolucionó más, se añadió agua (10 ml/mmol) para parar la reacción y la mezcla se extrajo con CH₂Cl₂ (3 × 30 ml/mmol). La fase orgánica combinada se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y el disolvente se evaporó a vacío. Los productos resultantes son aceites que no necesitaron purificación, salvo en el caso del compuesto **a4**.

1.3.1.1. 1-bencil-5-bromo-1H-indol (**a1**)

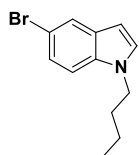


Seguendo el **Procedimiento General I**, **a** (500 mg, 2,55 mmol) [DMSO (13 ml), NaH (122 mg, 3,06 mmol), bromuro de bencilo (363 µl, 3,06 mmol)] dio lugar a **a1** (740 mg, > 99 %).

RMN de ¹H (acetona-*d*₆, 300 MHz) δ 7,76 (dd, 1H, *J*_{4,7} = 0,4 Hz, *J*_{4,6} = 1,9 Hz,

H4), 7,42 (d, 1H, $J_{2-3} = 3,2$ Hz, H2), 7,36–7,14 (m, 7H, Ar), 6,51 (d, 1H, $J_{2-3} = 3,2$ Hz, H3), 5,41 (s, 2H, CH₂). Datos espectrales acordes con la literatura ^[186].

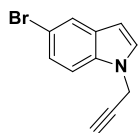
1.3.1.2. 5-bromo-1-butil-1H-indol (a2)



Seguendo el **Procedimiento General I, a** (200 mg, 1,02 mmol) [DMSO (5 ml), NaH (48 mg, 1,22 mmol), yoduro de butilo (139 μ l, 1,22 mmol)] dio lugar a **a2** (242 mg, 94 %).

RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,75 (d, 1H, $J_{4-6} = 1,8$ Hz, H4), 7,27 (dd, 1H, $J_{4-6} = 1,8$ Hz, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H6), 7,19 (d, 1H, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H7), 7,09 (d, 1H, $J_{2-3} = 3,1$ Hz, H2), 6,42 (d, 1H, $J_{2-3} = 3,1$ Hz, H3), 4,09 (t, 2H, $J_{\text{NCH}_2\text{CH}_2} = 7,1$ Hz, NCH₂), 1,81 (m, 2H, NCH₂CH₂), 1,36–1,24 (m, 2H, CH₂CH₃), 0,94 (t, 3H, $J_{\text{CH}_2\text{CH}_3} = 7,3$ Hz, CH₃).

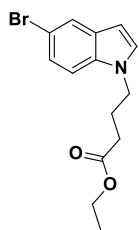
1.3.1.3. 5-bromo-1-(prop-2-ynil)-1H-indol (a3)



Seguendo el **Procedimiento General I, a** (200 mg, 1,02 mmol) [DMSO (2,5 ml), NaH (48 mg, 1,22 mmol), 3-bromoprop-1-ino (136 μ l, 1,22 mmol)] dio lugar a **a3** (235 mg, > 99 %).

RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,79 (d, 1H, $J_{4-6} = 1,8$ Hz, H4), 7,35 (dd, 1H, $J_{4-6} = 1,8$ Hz, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H6), 7,26 (d, 1H, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H7), 7,20 (d, 1H, $J_{2-3} = 3,2$ Hz, H2), 6,49 (d, 1H, $J_{2-3} = 3,2$ Hz, H3), 4,81 (d, 2H, $J_{\text{CH}_2\text{CCH}} = 2,6$ Hz, CH₂), 2,43 (t, 1H, $J_{\text{CHCCH}_2} = 2,6$ Hz, CH). Datos espectrales acordes con la literatura ^[187].

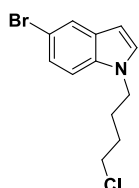
1.3.1.4. 4-(5-bromo-1H-indol-1-il)butanoato de etilo (a4)



Seguendo el **Procedimiento General I, a** (500 mg, 2,55 mmol) [DMSO (10 ml), NaH (122 mg, 3,06 mmol), 4-bromobutirato de etilo (461 μ l, 3,06 mmol)] dio lugar a **a4**. El crudo se purificó por cromatografía flash utilizando una mezcla de hexano/diclorometano (60/40) como eluyente (281 mg, 36 %).

RMN de ¹H (acetona-*d*₆, 300 MHz) δ 7,76 (d, 1H, $J_{4-6} = 1,8$ Hz, H4), 7,42 (d, 1H, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H7), 7,30 (d, 1H, $J_{2-3} = 3,3$ Hz, H2), 7,28 (dd, 1H, $J_{4-6} = 1,8$ Hz, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H6), 6,47 (d, 1H, $J_{2-3} = 3,3$ Hz, H3), 4,24 (t, 2H, $J_{\text{NCH}_2\text{CH}_2} = 7,0$ Hz, NCH₂), 4,09 (c, 2H, $J_{\text{CH}_2\text{CH}_3} = 7,1$ Hz, OCH₂), 2,28 (t, 2H, $J_{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}} = 6,8$ Hz, CH₂CO), 2,10 (m, 2H, NCH₂CH₂), 1,20 (t, 3H, $J_{\text{CH}_2\text{CH}_3} = 7,1$ Hz, CH₃).

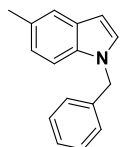
1.3.1.5. 5-bromo-1-(4-clorobutil)-1H-indol (a5)



Seguendo el **Procedimiento General I, a** (1 g, 5,10 mmol) [DMSO (7 ml), NaH (245 mg, 6,12 mmol), 1-cloro-4-yodobutano (1,1 ml, 8,67 mmol)] dio lugar a **a5** (1,4 g, > 99 %).

RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7,77 (d, 1H, $J_{4-6} = 1,8$ Hz, H4), 7,30 (dd, 1H, $J_{4-6} = 1,8$ Hz, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H6), 7,20 (d, 1H, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H7), 7,09 (d, 1H, $J_{2-3} = 3,1$ Hz, H2), 6,45 (d, 1H, $J_{2-3} = 3,1$ Hz, H3), 4,13 (t, 2H, $J_{\text{NCH}_2\text{CH}_2} = 6,9$ Hz, NCH_2), 3,50 (t, 2H, $J_{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}} = 6,4$ Hz, CH_2Cl), 2,05–1,93 y 1,80–1,68 (2 m, 4H, CH_2CH_2).

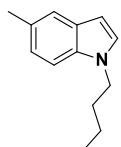
1.3.1.6. 1-bencil-5-metil-1H-indol (b1)



Siguiendo el **Procedimiento General I, b** (150 mg, 1,14 mmol) [DMSO (5,71 ml), NaH (55 mg, 1,37 mmol), bromuro de bencilo (163 μl , 1,37 mmol)] dio lugar a **b1** (282 mg, > 99 %).

RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,40 (m, 1H, H4), 7,32–7,12 (m, 7H, Ar), 6,96 (dd, 1H, $J_{4-6} = 1,5$ Hz, $J_{6-7} = 8,4$ Hz, H6), 6,45 (dd, 1H, $J_{3-7} = 0,8$ Hz, $J_{2-3} = 3,1$ Hz, H3), 5,33 (s, 2H, CH_2), 2,41 (s, 3H, CH_3). Datos espectrales acordes con la literatura ^[188].

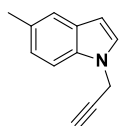
1.3.1.7. 1-butil-5-metil-1H-indol (b2)



Siguiendo el **Procedimiento General I, b** (200 mg, 1,53 mmol) [DMSO (7,62 ml), NaH (73 mg, 1,83 mmol), yoduro de butilo (208 μl , 1,83 mmol)] dio lugar a **b2** (235 mg, 82 %).

RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,38 (m, 1H, H4), 7,29 (d, 1H, $J_{6-7} = 8,4$ Hz, H7), 7,16 (d, 1H, $J_{2-3} = 3,1$ Hz, H2), 7,01 (dd, 1H, $J_{4-6} = 1,6$ Hz, $J_{6-7} = 8,4$ Hz, H6), 6,37 (dd, 1H, $J_{3-7} = 0,8$ Hz, $J_{2-3} = 3,1$ Hz, H3), 4,11 (t, 2H, $J_{\text{NCH}_2\text{CH}_2} = 7,0$ Hz, NCH_2), 2,44 (s, 3H, C5CH_3), 1,78 (m, 2H, NCH_2CH_2), 1,35–1,24 (m, 2H, CH_2CH_3), 0,93 (t, 3H, $J_{\text{CH}_2\text{CH}_3} = 7,4$ Hz, CH_2CH_3).

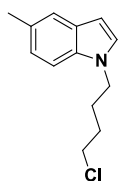
1.3.1.8. 5-metil-1-(prop-2-in-1-il)-1H-indol (b3)



Siguiendo el **Procedimiento General I, b** (150 mg, 1,14 mmol) [DMSO (2,29 ml), NaH (55 mg, 1,37 mmol), 3-bromoprop-1-ino (153 μl , 1,37 mmol)] dio lugar a **b3** (190 mg, > 99 %).

RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,51 (m, 1H, H4), 7,41 (d, 1H, $J_{6-7} = 8,3$ Hz, H7), 7,28 (d, 1H, $J_{2-3} = 3,2$ Hz, H2), 7,16 (dd, 1H, $J_{4-6} = 1,5$ Hz, $J_{6-7} = 8,3$ Hz, H6), 6,54 (dd, 1H, $J_{2-3} = 3,2$ Hz, H3), 4,88 (d, 2H, $J_{\text{CH}_2\text{CCH}} = 2,6$ Hz, CH_2), 2,91 (t, 1H, $J_{\text{CHCCH}_2} = 2,6$ Hz, CH), 2,39 (s, 3H, CH_3). Datos espectrales acordes con la literatura ^[189].

1.3.1.9. 1-(4-clorobutil)-5-metil-1H-indol (b5)

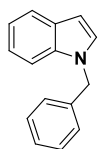


Siguiendo el **Procedimiento General I, b** (200 mg, 1,53 mmol) [DMSO (6 ml), NaH (73 mg, 1,83 mmol), 1-cloro-4-yodobutano (317 μl , 2,59 mmol)] dio lugar a **b5** (340 mg, > 99 %).

RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,38 (m, 1H, H4), 7,31 (d, 1H, $J_{6-7} = 8,4$ Hz,

H7), 7,18 (d, 1H, $J_{2-3} = 3,1$ Hz, H2), 7,01 (dd, 1H, $J_{4-6} = 1,3$ Hz, $J_{6-7} = 8,4$ Hz, H6), 6,38 (dd, 1H, $J_{3-7} = 0,7$ Hz, $J_{2-3} = 3,1$ Hz, H3), 4,15 (t, 2H, $J_{\text{NCH}_2\text{CH}_2} = 6,9$ Hz, NCH₂), 3,53 (t, 2H, $J_{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}} = 6,6$ Hz, CH₂Cl), 2,43 (s, 3H, CH₃), 1,98–1,87 y 1,76–1,65 (2m, 4H, CH₂CH₂).

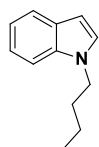
1.3.1.10. 1-bencil-1H-indol (c1)



Seguendo el **Procedimiento General I, c** (250 mg, 2,13 mmol) [DMSO (8 ml), NaH (102 mg, 2,56 mmol), bromuro de bencilo (303 μ l, 2,56 mmol)] dio lugar a **c1** (438 mg, > 99 %).

RMN de ¹H (acetona-*d*₆, 300 MHz) δ 7,77 (ddd, 1H, $J_{4-7} = 0,6$ Hz, $J_{4-6} = 3,0$ Hz, $J_{4-5} = 7,5$ Hz, H4), 7,45 (dm, 1H, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H7), 7,41–7,16 (m, 8H, Ar), 6,66 (dd, 1H, $J_{3-7} = 0,9$ Hz, $J_{2-3} = 3,3$ Hz, H3), 5,32 (s, 2H, CH₂). Datos espectrales acordes con la literatura ^[190].

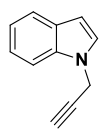
1.3.1.11. 1-butil-1H-indol (c2)



Seguendo el **Procedimiento General I, c** (250 mg, 2,13 mmol) [DMSO (8 ml), NaH (102 mg, 2,56 mmol), yoduro de butilo (291 μ l, 2,56 mmol)] dio lugar a **c2** (339 mg, 92 %).

RMN de ¹H (acetona-*d*₆, 300 MHz) δ 7,67 (ddd, 1H, $J_{4-7} = 0,9$ Hz, $J_{4-6} = 1,2$ Hz, $J_{4-5} = 7,8$ Hz, H4), 7,44 (dm, 1H, $J_{6-7} = 8,1$ Hz, H7), 7,26 (ddd, 1H, $J_{4-6} = 1,2$ Hz, $J_{5-6} = 7,4$ Hz, $J_{6-7} = 8,1$ Hz, H6), 7,22 (d, 1H, $J_{2-3} = 3,0$ Hz, H2), 7,13 (ddd, 1H, $J_{5-7} = 0,9$ Hz, $J_{5-6} = 7,4$ Hz, $J_{4-5} = 7,8$ Hz, H5), 6,52 (dd, 1H, $J_{3-7} = 0,6$ Hz, $J_{2-3} = 3,0$ Hz, H3), 4,12 (t, 2H, $J_{\text{NCH}_2\text{CH}_2} = 6,9$ Hz, NCH₂), 1,79 (m, 2H, NCH₂CH₂), 1,32 (m, 2H, CH₂CH₃), 0,95 (t, 3H, $J_{\text{CH}_2\text{CH}_3} = 8,8$ Hz, CH₃). Datos espectrales acordes con la literatura ^[191].

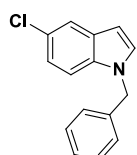
1.3.1.12. 1-(prop-2-in-1-il)-1H-indol (c3)



Seguendo el **Procedimiento General I, c** (250 mg, 2,13 mmol) [DMSO (8 ml), NaH (102 mg, 2,56 mmol), 3-bromoprop-1-ino (285 μ l, 2,56 mmol)] dio lugar a **c3** (289 mg, 87 %).

RMN de ¹H (acetona-*d*₆, 300 MHz) δ 7,70 (dm, 1H, $J_{4-5} = 7,8$ Hz, H4), 7,53 (dm, 1H, $J_{6-7} = 8,1$ Hz, H7), 7,34 (d, 1H, $J_{2-3} = 3,3$ Hz, H2), 7,29 (ddd, 1H, $J_{4-6} = 1,2$ Hz, $J_{5-6} = 7,2$ Hz, $J_{6-7} = 8,1$ Hz, H6), 7,19 (ddd, 1H, $J_{5-7} = 0,9$ Hz, $J_{4-5} = 7,8$ Hz, $J_{5-6} = 7,2$ Hz, H5), 6,58 (dd, 1H, $J_{3-7} = 0,7$ Hz, $J_{2-3} = 3,3$ Hz, H3), 4,98 (d, 2H, $J_{\text{CH}_2\text{CCH}} = 2,7$ Hz, CH₂), 2,92 (t, 1H, $J_{\text{CHCCH}_2} = 2,7$ Hz, CH).

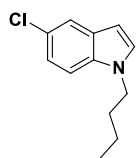
1.3.1.13. 1-bencil-5-cloro-1H-indol (d1)



Seguendo el **Procedimiento General I, d** (294 mg, 1,94 mmol) [DMSO (9 ml), NaH (93 mg, 2,33 mmol), bromuro de bencilo (275 μ l, 2,33 mmol)] dio lugar a **d1** (434 mg, 93 %).

RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,69 (dd, 1H, $J_{4-7} = 0,7$ Hz, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, H4), 7,40–7,13 (m, 8H, Ar), 6,56 (dd, 1H, $J_{3-7} = 0,9$ Hz, $J_{2-3} = 3,3$ Hz, H3), 5,33 (s, 2H, CH_2). Datos espectrales acordes con la literatura ^[186].

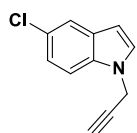
1.3.1.14. 1-butil-5-cloro-1H-indol (d2)



Siguiendo el **Procedimiento General I**, **d** (294 mg, 1,94 mmol) [DMSO (9 ml), NaH (93 mg, 2,34 mmol), yoduro de butilo (265 μl , 2,33 mmol)] dio lugar a **d2** (384 mg, 95 %).

RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,61 (bd, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, H4), 7,38 (bd, 1H, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H7), 7,27 (d, 1H, $J_{2-3} = 3,3$ Hz, H2), 7,16 (dd, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H6), 6,45 (dd, 1H, $J_{3-7} = 0,9$ Hz, $J_{2-3} = 3,3$ Hz, H3) 4,11 (t, 2H, $J_{\text{NCH}_2\text{CH}_2} = 7,2$ Hz, NCH_2), 1,75 (m, 2H, NCH_2CH_2), 1,29 (m, 2H, CH_2CH_3), 0,90 (t, 3H, $J_{\text{CH}_2\text{CH}_3} = 7,2$ Hz, CH_3).

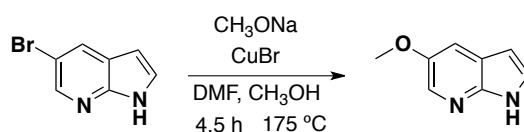
1.3.1.15. 5-cloro-1-(prop-2-in-1-il)-1H-indol (d3)



Siguiendo el **Procedimiento General**, **d** (245 mg, 1,62 mmol) [DMSO (8 ml), NaH (78 mg, 1,94 mmol), 3-bromoprop-1-ino (252 μl , 2,26 mmol)] dio lugar a **d3** (300 mg, 98 %).

RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,63 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, H4), 7,50 (bd, 1H, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H7), 7,40 (d, 1H, $J_{2-3} = 3,0$ Hz, H2), 7,21 (dd, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H6), 6,50 (dd, 1H, $J_{3-7} = 0,9$ Hz, $J_{2-3} = 3,0$ Hz, H3), 5,03 (d, 2H, $J_{\text{CH}_2\text{CCH}} = 2,7$ Hz, CH_2), 2,95 (t, 1H, $J_{\text{CHCCH}_2} = 2,7$ Hz, CH).

1.3.2. Síntesis de 5-metoxi-1H-pirrolo[2,3-b]piridina (f)

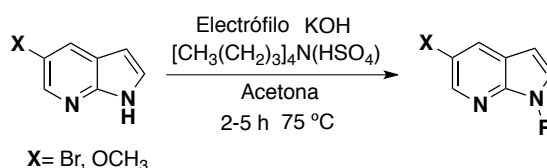


Se siguió el método descrito por Pei-Wen y col. ^[192]. A una disolución de 5-bromo-1H-pirrolo[2,3-b]piridina (**e**) (1 equiv, 1 g, 5,07 mmol) en una *N,N*-dimetilformamida (DMF) (6,31 ml/mmol, 32 ml) y CH_3OH (4 ml/mmol, 20 ml), bajo argón y agitación, se añadió consecutivamente CH_3ONa (53 equiv, 14,5 g, 268,7 mmol) y CuBr (2 equiv, 1,45 g, 10,1 mmol), a t.a. La mezcla se calentó a reflujo de 175 °C durante 4,5 h. Cuando la reacción no evolucionó más, se enfrió a t.a. y se eliminó el disolvente a vacío. El residuo se disolvió en agua (30 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3×30 ml/mmol). La fase orgánica combinada se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y el disolvente se evaporó a vacío. El crudo de reacción se purificó por

cromatografía flash, utilizando como eluyente una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (99/1). El producto resultante (**f**) es un sólido blanco (451 mg, 60 %).

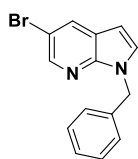
RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 9,23 (bs, 1H, NH), 8,12 (bs, 1H, H6), 7,49 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, H4), 7,31 (d, 1H, $J_{2-3} = 3,0$ Hz, H2), 6,45 (d, 1H, $J_{2-3} = 3,0$ Hz, H3), 3,90 (s, 3H, CH_3). Datos espectrales acordes con la literatura ^[192].

1.3.3. Procedimiento general II para la N_1 -alquilación de las 1H-pirrolo[2,3-b]piridinas (**e**) y (**f**)



Basado en el procedimiento descrito por García-Frutos y col. ^[193], a una disolución de **e** o **f** (1 equiv) en acetona (11 ml/mmol), se añadieron KOH (1,5 equiv), hidrógenosulfato de tetrabutilamonio (catalizador de transferencia de fase) (0,2 equiv) y el correspondiente haluro de alquilo (1,2 equiv). La mezcla se calentó a 75 °C con agitación en atmósfera inerte durante 2–5 h. Una vez completada la reacción, monitorizada por TLC, se dejó enfriar hasta t.a. y se añadió agua (10 ml/mmol). La mezcla de reacción se extrajo con CH_2Cl_2 (3×30 ml/mmol) y la fase orgánica combinada se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y el disolvente se evaporó a vacío. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna flash, utilizando como eluyente una mezcla de hexano/acetato de etilo (85/15), obteniéndose el producto como un aceite.

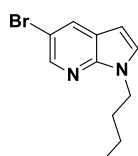
1.3.3.1. 1-bencil-5-bromo-1H-pirrolo[2,3-b]piridina (**e1**)



Siguiendo el **Procedimiento General II**, **e** (350 mg, 1,78 mmol) [KOH (168 mg, 2,70 mmol), $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3]_4\text{N}(\text{HSO}_4)$ (51 mg, 0,15 mmol), bromuro de bencilo (252 μl , 2,13 mmol), acetona (20 ml)] dio lugar a **e1** (506 mg, > 99 %).

RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 8,32 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, H6), 8,14 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, H4), 7,55 (d, 1H, $J_{2-3} = 3,3$ Hz, H2), 7,28 (m, 5H, Ar), 6,50 (d, 1H, $J_{2-3} = 3,3$ Hz, H3), 5,52 (s, 2H, CH_2). Datos espectrales acordes con la literatura ^[194].

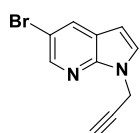
1.3.3.2. 5-bromo-1-butil-1H-pirrolo[2,3-b]piridina (**e2**)



Siguiendo el **Procedimiento General II**, **e** (350 mg, 1,78 mmol) [KOH (168 mg, 2,70 mmol), $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3]_4\text{N}(\text{HSO}_4)$ (51 mg, 0,15 mmol), 1-iodobutano (243 μl , 2,13 mmol), acetona (20 ml)] dio lugar a **e2** (452 mg, > 99 %).

RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 8,33 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, H6), 8,05 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, H4), 7,42 (d, 1H, $J_{2-3} = 3,6$ Hz, H2), 6,42 (d, 1H, $J_{2-3} = 3,6$ Hz, H3), 4,26 (t, 2H, $J_{\text{NCH}_2\text{CH}_2} = 7,2$ Hz, NCH_2), 1,79 (m, 2H, NCH_2CH_2), 1,26 (m, 2H, CH_2CH_3), 0,87 (t, 3H, $J_{\text{CH}_2\text{CH}_3} = 7,5$ Hz, CH_3).

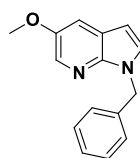
1.3.3.3. 5-bromo-1-(prop-2-in-1-il)-1H-pirrolo[2,3-b]piridina (e3)



Siguiendo el **Procedimiento General II**, e (400 mg, 2,03 mmol) [KOH (192 mg, 3,09 mmol), $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{HSO}_4)]$ (59 mg, 0,15 mmol), 3-bromoprop-1-ino (271 μl , 2,44 mmol), acetona (23 ml)] dio lugar a **e3** (255 mg, 53 %).

RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 8,32 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, H6), 8,11 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, H4), 7,60 (d, 1H, $J_{2-3} = 3,3$ Hz, H2), 6,51 (d, 1H, $J_{2-3} = 3,3$ Hz, H3), 5,14 (d, 2H, $J_{\text{CH}_2\text{CCH}} = 2,7$ Hz, CH_2), 2,94 (t, 1H, $J_{\text{CHCCH}_2} = 2,7$ Hz, CH).

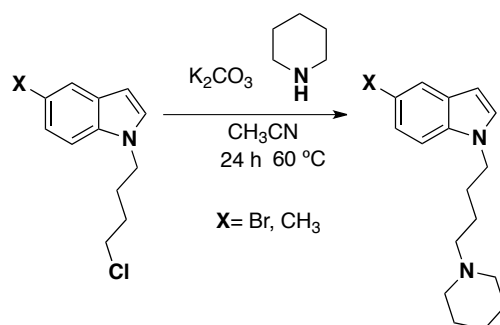
1.3.3.4. 1-bencil-5-metoxi-1H-pirrolo[2,3-b]piridina (f1)



Siguiendo el **Procedimiento General II**, f (80 mg, 0,054 mmol) [KOH (51 mg, 0,82 mmol), $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{HSO}_4)]$ (16 mg, 0,04 mmol), bromuro de bencilo (77 μl , 0,65 mmol), acetona (6 ml)] dio lugar a **f1** (128 mg, > 99 %).

RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 8,10 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,7$ Hz, H6), 7,52 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,7$ Hz, H4), 7,42 (d, 1H, $J_{2-3} = 3,3$ Hz, H2), 7,27 (m, 5H, Ar), 6,43 (d, 1H, $J_{2-3} = 3,3$ Hz, H3), 5,49 (s, 2H, CH_2), 3,84 (s, 3H, CH_3).

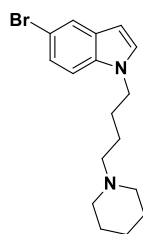
1.3.4. Procedimiento general III para la preparación de los 4-[(piperidin-1-il)butil]indoles a6 y b6



Se utilizó el método descrito por Martinelli y col.^[195], con pequeñas modificaciones. A una solución de **a5** o **b5** (1 equiv) y piperidina (1,2 equiv) en acetonitrilo (6,9 ml/mmol), a t.a., se adicionó K_2CO_3 anhidro (1 - 2 equiv). La suspensión resultante se agitó a 60 °C durante toda la noche. Cuando la reacción dejó de evolucionar, monitorizada por TLC, se llevó a t.a. y se añadió CH_2Cl_2 (10 ml/mmol). La mezcla de reacción se basificó con una solución acuosa de NaOH (10 %) (30 ml/mmol), se extrajo con CH_2Cl_2 (2×30 ml/mmol), y la fase orgánica

combinada se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y el disolvente se evaporó a vacío. El crudo se purificó por cromatografía en columna flash utilizando como eluyente una mezcla de hexano/acetato de etilo (50/50). Los productos resultantes son aceites incoloros.

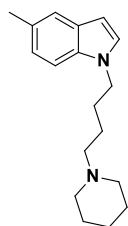
1.3.4.1. 5-bromo-1-(4-(piperidin-1-il)butil)-1H-indol (a6)



Siguiendo el **Procedimiento General III**, **a5** (107 mg, 0,37 mmol) [piperidina (44 μ l, 0,45 mmol), acetonitrilo (2,6 ml), K₂CO₃ (52 mg, 0,37 mmol)] dio lugar a **a6** (70 mg, 60 %).

RMN de ¹H (acetona-*d*₆, 300 MHz) δ 7,72 (d, 1H, J_{4-6} = 1,8 Hz, H4), 7,44 (bd, 1H, J_{6-7} = 8,7 Hz, H7), 7,33 (d, 1H, J_{2-3} = 3,2 Hz, H2), 7,24 (dd, 1H, J_{4-6} = 1,8 Hz, J_{6-7} = 8,7 Hz, H6), 6,43 (dd, 1H, J_{3-7} = 0,7 Hz, J_{2-3} = 3,2 Hz, H3), 4,22 [t, 2H, $J_{\text{NCH}_2\text{CH}_2}$ = 7,1 Hz, NCH₂(CH₂)₃N], 2,33–2,19 [m, 6H, N(CH₂)₃CH₂N y H2'], 1,85 [m, 2H, NCH₂CH₂(CH₂)₂N], 1,54–1,29 [m, 8H, N(CH₂)₂CH₂CH₂N, H3' y H4'].

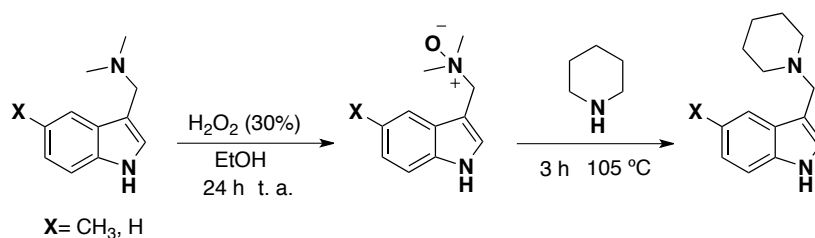
1.3.4.2. 5-metil-1-(4-(piperidin-1-il)butil)-1H-indol (b6)



Siguiendo el **Procedimiento General III**, **b5** (328 mg, 1,479 mmol) [piperidina (176 μ l, 1,78 mmol), acetonitrilo (10,2 ml), K₂CO₃ (409 mg, 2,96 mmol)] dio lugar a **b6** (180 mg, 45 %).

RMN de ¹H (acetona-*d*₆, 300 MHz) δ 7,36 (m, 1H, H4), 7,32 (bd, 1H, J_{6-7} = 8,1 Hz, H7), 7,17 (d, 1H, J_{2-3} = 3,1 Hz, H2), 6,98 (dd, 1H, J_{4-6} = 1,2 Hz, J_{6-7} = 8,1 Hz, H6), 6,35 (dd, 1H, J_{3-7} = 0,7 Hz, J_{2-3} = 3,1 Hz, H3), 4,13 [t, 2H, $J_{\text{NCH}_2\text{CH}_2}$ = 7,1 Hz, NCH₂(CH₂)₃N], 2,41 (s, 3H, CH₃), 2,32–2,19 [m, 6H, N(CH₂)₃CH₂N y H2'], 1,83 [m, 2H, NCH₂CH₂(CH₂)₂N], 1,57–1,28 [m, 8H, N(CH₂)₂CH₂CH₂N, H3' y H4'].

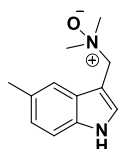
1.3.5. Procedimiento general IV para la síntesis de 16 y 25 mediante los intermedios *N*-óxidos b7 y c7



Basado en el procedimiento descrito por Henry y Leete^[196], con modificaciones. A una suspensión de gramina (**1**) o *N,N*-dimetil-1-(5-metil-1H-indol-3-il)metanamina (**15**) (1 equiv) en etanol absoluto (0,4 ml/mmol), bajo argón, agitación y a t.a., se adicionó H₂O₂ (30 %) (0,3 ml/mmol) y se produjo una ligera exotermicidad y la completa disolución de la suspensión. Se

extrajo el imán y se enfrió el matraz con un baño de hielo. Al cabo de 2 h, la mezcla de reacción empezó a cristalizar, se dejó toda la noche. Los cristales formados se lavaron con etanol absoluto frío, obteniéndose un sólido cristalino blanco. Una vez confirmada la formación de los *N*-óxidos mediante RMN de ^1H , **b7** o **c7** (1 equiv) se disolvieron en piperidina (4 ml/mmol) y se calentaron a reflujo durante 3 h. Posteriormente, la piperidina se evaporó a vacío y el crudo de reacción se recrystalizó en etanol absoluto para dar los productos puros **16** y **25**.

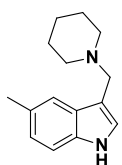
1.3.5.1. *N*-óxido de *N,N*-dimetil-1-(5-metil-1*H*-indol-3-il)metanamina (**b7**)



Siguiendo el **Procedimiento General IV**, **15** (40 mg, 0,21 mmol) [etanol absoluto (85 μl), H_2O_2 al 30 % (60 μl)] dio lugar a **b7** (32 mg, 74 %).

RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz) δ 7,52 (m, 2H, H2 y H4), 7,33 (d, 1H, $J_{6-7} = 8,3$ Hz, H7), 7,03 (bd, 1H, $J_{6-7} = 8,3$ Hz, H6), 4,59 (s, 2H, CH_2), 3,11 [s, 6H, $(\text{CH}_3)_2$], 2,46 (s, 3H, CH_3).

1.3.5.2. 5-metil-3-(piperidin-1-ilmetil)-1*H*-indol (**16**)



Siguiendo el **Procedimiento General IV**, **b7** (32 mg, 0,16 mmol) [piperidina (640 μl)] dio lugar a **16** (36 mg, > 99 %).

RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz) δ 7,40 (m, 1H, H4), 7,24 (d, 1H, $J_{6-7} = 8,3$ Hz, H7), 7,17 (s, 1H, H2), 6,95 (dd, 1H, $J_{4-6} = 1,3$ Hz, $J_{6-7} = 8,3$ Hz, H6), 3,72 (s, 2H, CH_2), 2,54 (m, 4H, H2'), 2,43 (s, 3H, CH_3), 1,60 (m, 4H, H3'), 1,51–1,38 (m, 2H, H4').

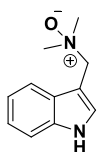
Se preparó su sal de oxalato mediante la adición gota a gota de una solución de ácido oxálico 1M en acetato de etilo anhidro (1 equiv), bajo argón, al compuesto previamente disuelto en acetato de etilo presecado con MgSO_4 anhidro. Tras 2 h de agitación, la sal se aisló mediante centrifugación y las trazas de disolvente se evaporaron a vacío ^[197].

Pf 186–188 °C.

RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 75,4 MHz) δ 163,9; 134,3; 128,6; 128,1; 127,7; 123,2; 117,9; 111,6; 102,1; 51,1; 50,6; 22,4; 21,3; 21,2.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$: C, 60,70; H, 7,19; N, 8,33. Encontrado: C, 60,73; H, 6,83; N, 8,29.

1.3.5.3. *N*-óxido de 1-(1*H*-indol-3-il)-*N,N*-dimetilmetanamina (**c7**)

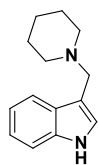


Siguiendo el **Procedimiento General IV**, **1** (200 mg, 1,15 mmol) [etanol absoluto (0,46 ml), H_2O_2 30 % (0,3 ml)] dio lugar a **c7** (230 mg, > 99 %).

RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz) δ 7,70 (ddd, 1H, $J_{4-7} = 0,8$ Hz, $J_{4-6} = 1,4$ Hz, $J_{4-5} = 7,7$ Hz, H4), 7,55 (s, 1H, H2), 7,42 (ddd, 1H, $J_{4-7} = 0,8$ Hz, $J_{5-7} = 1,2$ Hz, $J_{6-7} = 8,0$ Hz,

H7), 7,20–7,09 (m, 2H, H5 y H6), 4,60 (s, 2H, CH₂), 3,10 [s, 6H, (CH₃)₂]. Datos espectrales acordes con la literatura ^[196].

1.3.5.4. 3-(piperidin-1-ilmetil)-1H-indol (25)



Siguiendo el **Procedimiento General IV**, **c7** (230 mg, 1,21 mmol) [piperidina (4,6 ml)] dio lugar a **25** como un cristal marrón (191 mg, 74 %).

RMN de ¹H (CD₃OD, 300 MHz) δ 7,64 (dm, 1H, *J*₄₋₅ = 7,8 Hz, H4), 7,39 (dm, 1H, *J*₆₋₇ = 8,0 Hz, H7), 7,24 (s, 1H, H2), 7,16–7,02 (m, 2H, H5 y H6), 3,76 (s, 2H, CH₂),

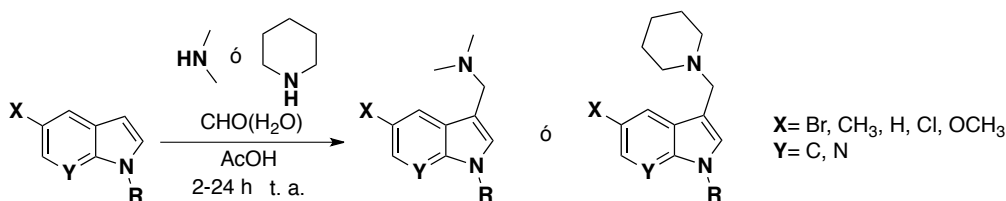
2,56 (m, 4H, H2'), 1,63 (m, 4H, H3'), 1,52–1,41 (m, 2H, H4'). Datos espectrales acordes con la literatura ^[198].

Pf 152–154 °C. (lit. 158 °C)

RMN de ¹³C (CD₃OD, 75,4 MHz) δ 137,8; 129,6; 126,3; 122,3; 120,0; 119,6; 112,2; 110,7; 55,0; 54,3; 26,4; 25,1.

Anal. Elem. calc. para C₁₄H₁₈N₂: C, 78,46; H, 8,47; N, 13,07. Encontrado: C, 78,15; H, 8,41; N, 13,05.

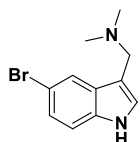
1.3.6. Procedimiento general V para síntesis de los derivados 2–14, 17–24 y 26–46



Según el método descrito por Miranda y col. ^[199], con modificaciones. Una disolución de dimetilamina (40 %_{aq}) o piperidina (1–1,5 equiv) y formaldehído (37 %_{aq}) (1–2 equiv) en ácido acético glacial (0,3–5,5 ml/mmol), bajo argón y agitada durante 10 min, se adicionó sobre una disolución del sustrato especificado en cada caso (1 equiv) en ácido acético glacial (0,1–2 ml/mmol) a 0 °C. Transcurridos 5 min, se llevó a t.a. y se agitó durante 2–24 h. Se siguió la evolución de la reacción por TLC, y cuando se consumió el sustrato o no evolucionó más, se adicionó gota a gota una solución acuosa de NaOH (30 %), hasta pH 14. El crudo se extrajo con CH₂Cl₂ (3 × 30 ml/mmol) y la fase orgánica combinada se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y el disolvente se evaporó a vacío. Aquellos productos finales que no fueron sólidos sino aceites, se salinizaron a sales de clorhidrato u oxalato. Las sales de clorhidratos se prepararon mediante la adición gota a gota de HCl 1M en éter etílico (1 equiv), bajo argón, sobre los compuestos previamente disueltos en éter etílico seco (10 ml) ^[200]. Las sales de oxalato se prepararon

mediante la adición gota a gota de una solución de ácido oxálico 1M en acetato de etilo seco (1 equiv), bajo argón, al compuesto previamente disuelto en acetato de etilo. Una vez añadida la cantidad necesaria de ácido, se mantuvieron en agitación 2 h. El sólido formado se decantó por centrifugación y las trazas de disolvente se evaporaron a vacío ^[197]. Los disolventes empleados en la salinización se secaron previamente sobre MgSO₄ anhidro.

1.3.6.1. 1-(5-bromo-1H-indol-3-il)-N,N-dimetilmetanamina (2)



Siguiendo el **Procedimiento General V, a** (200 mg, 1,02 mmol) [dimetilamina (129 µl, 1,02 mmol), formaldehído (76 µl, 1,02 mmol), ácido acético glacial (1 ml)] dio lugar a **2** como un sólido marrón que no requirió purificación (234 mg, 80 %).

RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 8,35 (bs, 1H, NH), 7,84 (d, 1H, *J*₄₋₆ = 1,6 Hz, H4), 7,28 (dd, 1H, *J*₄₋₆ = 1,6 Hz, *J*₆₋₇ = 8,6 Hz, H6), 7,20 (d, 1H, *J*₆₋₇ = 8,6 Hz, H7), 7,10 (s, 1H, H2), 3,58 (s, 2H, CH₂), 2,28 [s, 6H, N(CH₃)₂]. Datos espectrales acordes con la literatura ^[201].

Pf 134–137 °C.

RMN de ¹³C (acetona-*d*₆, 75,4 MHz) δ 136,6; 130,7; 126,5; 124,8; 123,0; 114,0; 113,8; 112,5; 55,7; 45,5.

Anal. Elem. calc. para C₁₁H₁₃BrN₂: C, 52,19; H, 5,18; N, 11,07. Encontrado: C, 51,89; H, 5,12; N, 10,64.

1.3.6.2. 5-bromo-3-(piperidin-1-ilmetil)-1H-indol (3)



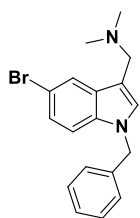
Siguiendo el **Procedimiento General V, a** (200 mg, 1,02 mmol) [piperidina (99 µl, 1,02 mmol), formaldehído (76 µl, 1,02 mmol), ácido acético glacial (0,5 ml)] dio lugar a **3** como un sólido amarillo que no requirió purificación (238 mg, 80 %).

RMN de ¹H (acetona-*d*₆, 300 MHz) δ 10,28 (bs, 1H, NH), 7,89 (bd, 1H, *J*₄₋₆ = 2,0 Hz, H4), 7,34 (dd, 1H, *J*₄₋₇ = 0,3 Hz, *J*₆₋₇ = 8,6 Hz, H7), 7,25 (d, 1H, *J*_{2-NH} = 2,3 Hz, H2), 7,20 (dd, 1H, *J*₄₋₆ = 2,0 Hz, *J*₆₋₇ = 8,6 Hz, H6), 3,59 (s, 2H, C3CH₂), 2,38 (m, 4H, H2'), 1,56–1,47 (m, 4H, H3'), 1,45–1,36 (m, 2H, H4'). Datos espectrales acordes con la literatura ^[198].

Pf 131–134 °C. (lit. 141 °C)

RMN de ¹³C (acetona-*d*₆, 75,4 MHz) δ 136,5; 130,7; 126,3; 124,7; 122,9; 113,9; 113,3; 112,4; 55,2; 55,1; 26,9; 25,4.

Anal. Elem. calc. para C₁₄H₁₇BrN₂: C, 57,35; H, 5,84; N, 9,55. Encontrado: C, 56,94; H, 5,91; N, 9,32.

1.3.6.3. 1-(1-bencil-5-bromo-1H-indol-3-il)-N,N-dimetilmetanamina (4)

Seguendo el **Procedimiento General V**, **a1** (97 mg, 0,34 mmol) [dimetilamina (43 μ l, 0,34 mmol), formaldehído (25 μ l, 0,34 mmol), ácido acético glacial (2 ml)] dio lugar a **4** como un aceite que no requirió purificación (114 mg, > 99 %).

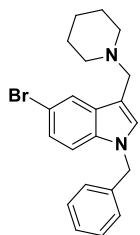
RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7,83 (bd, 1H, $J_{4-6} = 1,8$ Hz, H4), 7,31–7,19 (m, 4H, Ar), 7,11–7,03 (m, 4H, Ar), 5,24 (s, 2H, NCH_2Ph), 3,55 (s, 2H, C3CH_2), 2,26 [s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$].

Se preparó la sal de clorhidrato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V.

Pf 209–212 $^\circ\text{C}$.

RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 75,4 MHz) δ 137,3; 134,6; 133,5; 129,6; 128,6; 127,6; 127,0; 124,5; 121,6; 112,9; 112,7; 103,0; 50,5; 49,4; 41,1.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{BrN}_2\cdot\text{HCl}$: C, 56,94; H, 5,31; N, 7,38. Encontrado: C, 56,53; H, 5,10; N, 7,05.

1.3.6.4. 1-bencil-5-bromo-3-(piperidin-1-ilmetil)-1H-indol (5)

Seguendo el **Procedimiento General V**, **a1** (138 mg, 0,48 mmol) [piperidina (48 μ l, 0,48 mmol), formaldehído (35 μ l, 0,48 mmol), ácido acético glacial (0,5 ml)] dio lugar a **5** como un aceite que no requirió purificación (173 mg, 94 %).

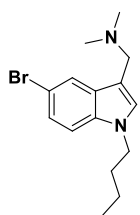
RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7,86 (d, 1H, $J_{4-6} = 1,7$ Hz, H4), 7,33–7,18 (m, 4H, Ar), 7,10–7,03 (m, 4H, Ar), 5,23 (s, 2H, NCH_2Ph), 3,61 (s, 2H, C3CH_2), 2,42 (m, 4H, H_2'), 1,57 (m, 4H, H_3'), 1,41 (m, 2H, H_4').

Se preparó la sal de clorhidrato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V.

Pf 199–202 $^\circ\text{C}$.

RMN de ^{13}C (D_2O + gotas de acetona- d_6 para calibración, 75,4 MHz) δ 137,3; 135,2; 133,9; 130,2; 129,3; 128,4; 127,4; 125,5; 121,4; 113,9; 113,0; 102,0; 52,5; 51,3; 50,4; 23,2; 21,5.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{BrN}_2\cdot 2\text{HCl}$: C, 55,28; H, 5,52; N, 6,14. Encontrado: C, 54,92; H, 5,33; N, 6,17.

1.3.6.5. 1-(5-bromo-1-butil-1H-indol-3-il)-N,N-dimetilmetanamina (6)

Seguendo el **Procedimiento General V**, **a2** (240 mg, 0,95 mmol) [dimetilamina (120 μ l, 0,95 mmol), formaldehído (72 μ l, 0,95 mmol), ácido acético glacial (1 ml)] dio lugar a **6**, que fue purificado por cromatografía en columna flash utilizando como eluyente hexano/acetato de etilo (10/90), obteniéndose el producto puro como un aceite amarillo (316 mg, > 99 %).

RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7,80 (d, 1H, $J_{4-6} = 1,7$ Hz, H4), 7,25 (dd, 1H, $J_{4-6} = 1,7$ Hz, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H6), 7,16 (d, 1H, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H7), 7,02 (s, 1H, H2), 4,05 [t, 2H, $J_{\text{NCH}_2\text{CH}_2} = 7,0$ Hz,

$\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$], 3,54 (s, 2H, C_3CH_2), 2,25 [s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$], 1,78 (m, 2H, NCH_2CH_2), 1,37–1,23 (m, 2H, CH_2CH_3), 0,92 (t, 3H, $J_{\text{CH}_2\text{CH}_3} = 7,3$ Hz, CH_3).

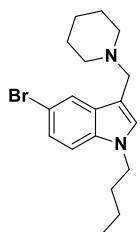
Se preparó la sal de clorhidrato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V.

Pf 84–88 °C.

RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 75,4 MHz) δ 134,6; 133,1; 129,4; 124,3; 121,4; 112,6; 112,4; 102,3; 50,5; 45,5; 41,0; 31,7; 19,3; 13,5.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{BrN}_2 \cdot 2\text{HCl}$: C, 47,14; H, 6,07; N, 7,33. Encontrado: C, 46,89; H, 6,38; N, 6,95.

1.3.6.6. 5-bromo-1-butil-3-(piperidin-1-ilmetil)-1H-indol (7)



Siguiendo el **Procedimiento General V**, **a2** (185 mg, 0,73 mmol) [piperidina (73 μl , 0,73 mmol), formaldehído (66 μl , 0,88 mmol), ácido acético glacial (0,5 ml)] dio lugar a **7** como un aceite que no requirió purificación (279 mg, > 99 %).

RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7,83 (d, 1H, $J_{4-6} = 1,8$ Hz, H4), 7,26 (dd, 1H, $J_{4-6} = 1,8$ Hz, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H6), 7,16 (d, 1H, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H7), 7,03 (s, 1H, H2), 4,04 [t, 2H, $J_{\text{NCH}_2\text{CH}_2} = 7,1$ Hz, $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$], 3,62 (s, 2H, C_3CH_2), 2,47–2,36 (m, 4H, H2'), 1,79 (m, 2H, NCH_2CH_2), 1,58 (m, 4H, H3'), 1,47–1,37 (m, 2H, H4'), 1,37–1,24 (m, 2H, CH_2CH_3), 0,93 (t, 3H, $J_{\text{CH}_2\text{CH}_3} = 7,3$ Hz, CH_3).

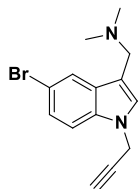
Se preparó la sal de clorhidrato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V.

Pf 177–180 °C.

RMN de ^{13}C (D_2O + gotas de acetona- d_6 para calibración, 75,4 MHz) δ 134,8; 133,2; 129,3; 124,8; 120,8; 113,0; 112,4; 100,8; 52,1; 51,1; 46,0; 31,4; 22,8; 21,1; 19,3; 12,8.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{BrN}_2 \cdot \text{HCl}$: C, 54,04; H, 6,79; N, 7,26. Encontrado: C, 55,65; H, 6,63; N, 7,04.

1.3.6.7. 1-(5-bromo-1-(2-propinil)-1H-indol-3-il)-N,N-dimetilmetanamina (8)



Siguiendo el **Procedimiento General V**, **a3** (126 mg, 0,54 mmol) [dimetilamina (68 μl , 0,54 mmol), formaldehído (40 μl , 0,54 mmol), ácido acético glacial (1 ml)] dio lugar a **8** como un aceite que no requirió purificación (154 mg, 98 %).

RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,88 (d, 1H, $J_{4-6} = 1,9$ Hz, H4), 7,44 (d, 1H, $J_{6-7} = 8,5$ Hz, H7), 7,29 (dd, 1H, $J_{4-6} = 1,9$ Hz, $J_{6-7} = 8,5$ Hz, H6), 7,29 (s, 1H, H2), 5,04 (d, 2H, $J_{\text{NCH}_2\text{CCH}} = 2,5$ Hz, NCH_2CCH), 3,53 (s, 2H, C_3CH_2), 2,94 (t, 1H, $J_{\text{NCH}_2\text{CCH}} = 2,5$ Hz, CH), 2,19 [s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$].

Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V.

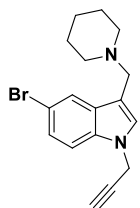
Pf 161–163 °C.

RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,4 MHz) δ 163,7; 134,4; 132,6; 129,7; 124,8; 121,7; 113,2; 112,7; 103,5; 78,6; 76,4; 50,5; 41,3; 35,6.

EMAR calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{BrN}_2$ 291,0491 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$. Encontrado 291,0496 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{BrN}_2 \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot 2\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$: C, 44,19; H, 4,33; N, 5,73. Encontrado: C, 44,15; H, 4,02; N, 5,78.

1.3.6.8. 5-bromo-3-(piperidin-1-ilmetil)-1-(2-propinil)-1H-indol (9)



Seguendo el **Procedimiento General V**, **a3** (230 mg, 0,98 mmol) [piperidina (97 μl , 0,98 mmol), formaldehído (74 μl , 0,98 mmol), ácido acético glacial (1 ml)] dio lugar a **9** como un sólido marrón que no requirió purificación (320 mg, 98 %).

RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,91 (bd, 1H, $J_{4-6} = 2,0$ Hz, H4), 7,44 (dd, 1H, $J_{4-7} = 0,4$ Hz, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H7), 7,31–7,27 (m, 2H, H6, H2), 5,04 (d, 2H, $J_{\text{NCH}_2\text{CCH}} = 2,5$ Hz, NCH_2CCH), 3,57 (s, 2H, C_3CH_2), 2,95 (t, 1H, $J_{\text{NCH}_2\text{CCH}} = 2,5$ Hz, CH), 2,38 (m, 4H, H2'), 1,56–1,49 (m, 4H, H3'), 1,44–1,41 (m, 2H, H4').

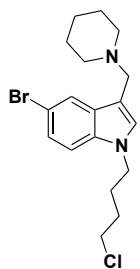
Pf 67–70 $^\circ\text{C}$.

RMN de ^{13}C (acetona- d_6 , 75,4 MHz) δ 136,1; 131,4; 129,2; 125,0; 123,3; 113,4; 112,9; 112,4; 79,1; 74,8; 55,1; 54,9; 36,1; 26,9; 25,3.

EMAR calc. para $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{BrN}_2$ 331,0810 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$. Encontrado 331,0804 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{BrN}_2$: C, 61,64; H, 5,78; N, 8,46. Encontrado: C, 61,21; H, 5,97; N, 8,60.

1.3.6.9. 5-bromo-1-(4-clorobutil)-3-(piperidin-1-ilmetil)-1H-indol (10)



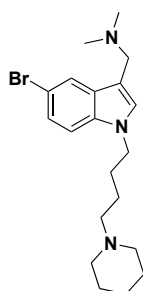
Seguendo el **Procedimiento General V**, **a5** (311 mg, 1,08 mmol) [piperidina (107 μl , 1,09 mmol), formaldehído (81 μl , 1,09 mmol), ácido acético glacial (0,9 ml)] dio lugar a **10**, el cual se obtuvo puro mediante trituración con éter etílico, como un aceite amarillo (419 mg, > 99 %).

RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,89 (dd, 1H, $J_{4-7} = 0,3$ Hz, $J_{4-6} = 1,9$ Hz, H4), 7,38 (bd, 1H, $J_{6-7} = 8,5$ Hz, H7), 7,23 (dd, 1H, $J_{4-6} = 1,9$ Hz, $J_{6-7} = 8,5$ Hz, H6), 7,22 (s, 1H, H2), 4,18 [t, 2H, $J_{\text{NCH}_2\text{CH}_2} = 6,9$ Hz, $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_3\text{Cl}$], 3,58 (t, 2H, $J_{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}} = 6,6$ Hz, CH_2Cl), 3,56 (s, 2H, C_3CH_2), 2,37 (m, 4H, H2'), 2,02–1,70 y 1,80–1,70 (2m, 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$), 1,56–1,45 (m, 4H, H3'), 1,45–1,35 (m, 2H, H4').

RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,4 MHz) δ 146,0; 140,8; 139,3; 134,4; 132,9; 122,3; 122,1; 121,9; 64,8; 64,7; 55,7; 54,9; 40,4; 38,1; 36,6; 35,0.

EMAR calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{BrClN}_2$ 383,0884 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$. Encontrado 383,0903 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{BrClN}_2$: C, 56,34; H, 6,30; N, 7,30. Encontrado: C, 56,42; H, 6,46; N, 7,02.

1.3.6.10. 1-(5-bromo-1-(4-(piperidin-1-il)butil)-1H-indol-3-il)-N,N-dimetilmetanamina (11)

Siguiendo el **Procedimiento General V**, **a6** (92 mg, 0,27 mmol) [dimetilamina (35 μ l, 0,27 mmol), formaldehído (21 μ l, 0,27 mmol), ácido acético glacial (1,8 ml)] dio lugar a **11** como un aceite que no requirió purificación (115 mg, > 99 %).

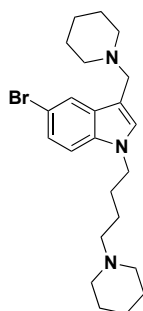
RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,85 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,0$ Hz, H4), 7,39 (d, 1H, $J_{6-7} = 8,6$ Hz, H7), 7,23 (dd, 1H, $J_{4-6} = 2,0$ Hz, $J_{6-7} = 8,6$ Hz, H6), 7,22 (s, 1H, H2), 4,18 [t, 2H, $J = 7,1$ Hz, $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_3\text{N}$], 3,52 (s, 2H, C3CH_2), 2,30–2,19 [m, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{N}$, H2'], 2,17 [s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$], 1,83 [m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{N}$], 1,53–1,32 [m, 8H, $\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$, H3', H4'].

Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V.

Pf 123–125 $^\circ\text{C}$.

RMN de ^{13}C (D_2O + gotas de acetona- d_6 para calibración, 75,4 MHz) δ 165,7; 135,2; 133,2; 129,4; 125,5; 121,2; 113,6; 112,6; 102,1; 56,5; 53,3; 52,1; 45,9; 41,8; 26,8; 23,0; 21,4; 21,2.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{BrN}_3 \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot 2\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$: C, 48,82; H, 6,15; N, 7,12. Encontrado: C, 49,26; H, 6,04; N, 6,75.

1.3.6.11. 5-bromo-1-(4-(piperidin-1-il)butil)-3-(piperidin-1-ilmetil)-1H-indol (12)

Siguiendo el **Procedimiento General V**, **a6** (70 mg, 0,21 mmol) [piperidina (21 μ l, 0,21 mmol), formaldehído (16 μ l, 0,21 mmol), ácido acético glacial (400 μ l)] dio lugar a **12** como un aceite que no requirió purificación (90 mg, > 99 %).

RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,99 (d, 1H, $J_{4-6} = 1,8$ Hz, H4), 7,37 (d, 1H, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H7), 7,22 (dd, 1H, $J_{4-6} = 1,8$ Hz, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H6), 7,19 (s, 1H, H2), 4,16 [t, 2H, $J = 7,1$ Hz, $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_3\text{N}$], 3,56 (s, 2H, C3CH_2), 2,37 (m, 4H, H2'), 2,29–2,18 [m, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{N}$, H2'], 1,83 [m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{N}$], 1,55–

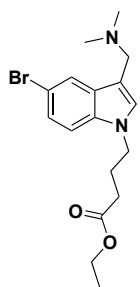
1,34 [m, 14H, $\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$, H3', H4', H3'', H4''].

Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V. Pf 90–92 $^\circ\text{C}$.

RMN de ^{13}C (D_2O + gotas de acetona- d_6 para calibración, 75,4 MHz) δ 168,2; 135,1; 133,3; 129,8; 125,4; 121,4; 113,7; 112,6; 101,8; 56,5; 53,3; 52,5; 51,4; 45,9; 26,8; 23,2; 23,0; 21,5; 21,2.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{BrN}_3 \cdot 2\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$: C, 52,94; H, 6,25; N, 6,86. Encontrado: C, 52,89; H, 6,67; N, 6,86.

1.3.6.12. 4-(5-bromo-3-((dimetilamino)metil)-1H-indol-1-il)butanoato de etilo (13)



Siguiendo el **Procedimiento General V**, **a4** (98 mg, 0,32 mmol) [dimetilamina (60 μ l, 0,47 mmol), formaldehído (34 μ l, 0,47 mmol), ácido acético glacial (1,8 ml)] dio lugar a **13** como un aceite que no requirió purificación (110 mg, 95 %).

RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,86 (d, 1H, $J_{4-6} = 1,9$ Hz, H4), 7,38 (d, 1H, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H7), 7,25 (dd, 1H, $J_{4-6} = 1,9$ Hz, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H6), 7,21 (s, 1H, H2), 4,23 [t, 2H, $J_{\text{NCH}_2\text{CH}_2} = 7,0$ Hz, $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2$], 4,07 (c, 2H, $J_{\text{OCH}_2\text{CH}_3} = 7,1$ Hz, CH_2CH_3), 3,53 (s, 2H, C_3CH_2), 2,28 (t, 2H, $J_{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}} = 7,8$ Hz, CH_2CO), 2,18 [s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$], 2,10 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1,19 (t, 3H, $J_{\text{CH}_2\text{CH}_3} = 7,1$ Hz, CH_3).

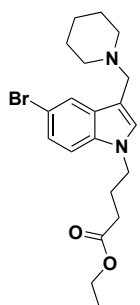
Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V.

Pf 133–135 $^\circ\text{C}$.

RMN de ^{13}C (CD_3OD , 75,4 MHz) δ 176,3; 165,5; 135,9; 134,0; 130,0; 126,0; 121,7; 114,2; 113,2; 102,6; 62,6; 52,7; 46,5; 42,4; 32,2; 25,6; 14,0.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{BrN}_2\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$: C, 48,01; H, 5,73; N, 5,89. Encontrado: C, 48,05; H, 5,33; N, 5,45.

1.3.6.13. 4-(5-bromo-3-(piperidin-1-ilmetil)-1H-indol-1-il)butanoato de etilo (14)



Siguiendo el **Procedimiento General V**, **a4** (100 mg, 0,32 mmol) [piperidina (48 μ l, 0,48 mmol), formaldehído (36 μ l, 0,48 mmol), ácido acético glacial (1,1 ml)] dio lugar a **14** como un aceite que no requirió purificación (133 mg, > 99 %).

RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,90 (d, 1H, $J_{4-6} = 1,9$ Hz, H4), 7,38 (d, 1H, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H7), 7,25 (dd, 1H, $J_{4-6} = 1,9$ Hz, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H6), 7,21 (s, 1H, H2), 4,22 [t, 2H, $J_{\text{NCH}_2\text{CH}_2} = 7,1$ Hz, $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CO}$], 4,07 (c, 2H, $J_{\text{OCH}_2\text{CH}_3} = 7,1$ Hz, CH_2CH_3), 3,58 (s, 2H, C_3CH_2), 2,38 (m, 4H, H2'), 2,28 (t, 2H, $J_{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}} = 7,1$ Hz, CH_2COO), 2,09 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1,57–1,46 (m, 4H, H3'), 1,46–1,35 (m, 2H, H4'), 1,19 (t, 3H, $J_{\text{OCH}_2\text{CH}_3} = 7,1$ Hz, CH_3).

Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V.

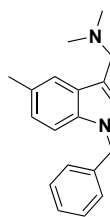
Pf 158–160 $^\circ\text{C}$.

RMN de ^{13}C (CD_3OD , 75,4 MHz) δ 220; 176,0; 136,0; 133,9; 130,5; 126,1; 121,8; 114,4; 113,2; 102,5; 62,4; 53,1; 52,0; 46,5; 32,2; 25,8; 23,8; 22,2; 14,0.

HRMS calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{BrN}_2\text{O}_2$ 407,1329 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$. Encontrado 407,1314 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{BrN}_2\text{O}_2 \cdot \text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$: C, 53,13; H, 5,88; N, 5,63. Encontrado: C, 53,16; H, 5,85; N, 5,50.

1.3.6.14. 1-(1-bencil-5-metil-1H-indol-3-il)-N,N-dimetilmetanamina (17)



Siguiendo el **Procedimiento General V**, **b1** (126 mg, 0,57 mmol) [dimetilamina (72 μ l, 0,57 mmol), formaldehído (43 μ l, 0,57 mmol), ácido acético glacial (0,6 ml)] dio lugar a **17** como un aceite que no requirió purificación (154 mg, 97 %).

RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,51 (m, 1H, H4), 7,31–7,13 (m, 7H, Ar), 6,94 (dd, 1H, $J_{4-6} = 1,3$ Hz, $J_{6-7} = 8,3$ Hz, H6), 5,34 (s, 2H, NCH_2Ph), 3,56 (s, 2H, C3CH_2), 2,39 (s, 3H, C5CH_3), 2,21 [s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2)_3$].

Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V.

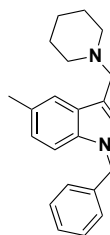
Pf 166–169 $^\circ\text{C}$.

RMN de ^{13}C (D_2O + gotas de acetona- d_6 para calibración, 75,4 MHz) δ 215,8; 137,8; 134,8; 132,6; 130,9; 129,2; 128,4; 128,2; 127,3; 124,6; 118,3; 111,1; 102,1; 52,4; 50,2; 41,8; 20,8.

HRMS calc. para $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2$ 279,1856 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$. Encontrado 279,1843 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2 \cdot \text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$: C, 68,46; H, 6,57; N, 7,60. Encontrado: C, 68,18; H, 6,43; N, 7,26.

1.3.6.15. 1-bencil-5-metil-3-(piperidin-1-ilmetil)-1H-indol (**18**)



Siguiendo el **Procedimiento General V**, **b1** (254 mg, 1,15 mmol) [piperidina (113 μ l, 1,15 mmol), formaldehído (86 μ l, 1,15 mmol), ácido acético glacial (2 ml)] dio lugar a **18** como un aceite que no requirió purificación (355 mg, 97 %).

RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,53 (m, 1H, H4), 7,30–7,14 (m, 7H, Ar), 6,93 (dd, 1H, $J_{4-6} = 1,2$ Hz, $J_{6-7} = 8,3$ Hz, H6), 5,32 (s, 2H, NCH_2Ph), 3,60 (d, 2H, $J_{\text{CH}_2\text{H}_2} = 0,7$ Hz, C3CH_2), 2,44–2,37 (m, 4H, H_2'), 2,40 (s, 3H, C5CH_3), 1,53 (m, 4H, H_3'), 1,42 (m, 2H, H_4').

Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V.

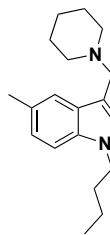
Pf 172–174 $^\circ\text{C}$.

RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 75,4 MHz) δ 164,6; 137,8; 134,3; 132,0; 128,7; 128,5; 128,4; 127,4; 127,0; 123,5; 118,4; 110,3; 102,1; 51,0; 50,2; 49,2; 22,4; 21,4; 21,1.

EMAR calc. para $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_2$ 319,2169 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$. Encontrado 319,2178 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_2 \cdot \text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$: C, 70,57; H, 6,91; N, 6,86. Encontrado: C, 70,36; H, 6,86; N, 6,59.

1.3.6.16. 1-butil-5-metil-3-(piperidin-1-ilmetil)-1H-indol (**19**)



Siguiendo el **Procedimiento General V**, **b2** (143 mg, 0,76 mmol) [piperidina (75 μ l, 0,76 mmol), formaldehído (57 μ l, 0,76 mmol), ácido acético glacial (0,8 ml)] dio lugar a **19** como un aceite que no requirió purificación (204 mg, 94 %).

RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,50 (m, 1H, H4), 7,25 (d, 1H, $J_{6-7} = 8,3$ Hz, H7), 7,08 (s, 1H, H2), 6,96 (dd, 1H, $J_{4-6} = 1,4$ Hz, $J_{6-7} = 8,3$ Hz, H6), 4,10 [t, 2H,

$J_{\text{NCH}_2\text{CH}_2} = 7 \text{ Hz}$, $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$], 3,58 (d, 2H, $J_{\text{C}_3\text{CH}_2\text{H}_2} = 0,5 \text{ Hz}$, C_3CH_2), 2,44–2,36 (m, 4H, H_2'), 2,40 (s, 3H, C_5CH_3), 1,77 (m, 2H, NCH_2CH_2), 1,53 (m, 4H, H_3'), 1,45–1,35 (m, 2H, H_4'), 1,35–1,24 (m, 2H, CH_2CH_3), 0,91 (t, 3H, $J_{\text{CH}_2\text{CH}_3} = 7,3 \text{ Hz}$, CH_2CH_3).

Se preparó la sal de clorhidrato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V.

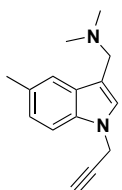
Pf 140–143 °C.

RMN de ^{13}C (D_2O + gotas de acetona- d_6 para calibración, 75,4 MHz) δ 134,7; 132,4; 130,5; 128,3; 124,1; 118,2; 110,8; 100,8; 52,3; 51,7; 46,2; 31,8; 23,1; 21,4; 20,8; 19,7; 13,2.

HRMS calc. para $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{N}_2$ 285,2325 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$. Encontrado 285,2334 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{N}_2 \cdot \text{HCl}$: C, 71,11; H, 9,11; N, 8,73. Encontrado: C, 71,20; H, 8,96; N, 8,42.

1.3.6.17. *N,N*-dimetil-1-(5-metil-1-(prop-2-in-1-il)-1H-indol-3-il)metanamina (20)



Siguiendo el **Procedimiento General V**, **b3** (236 mg, 1,40 mmol) [dimetilamina (177 μl , 1,40 mmol), formaldehído (105 μl , 1,40 mmol), ácido acético glacial (1,8 ml)] dio lugar a **20** como un aceite que no requirió purificación (282 mg, 90 %).

RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,50 (m, 1H, H_4), 7,33 (d, 1H, $J_{6-7} = 8,3 \text{ Hz}$, H_7), 7,17 (s, 1H, H_2), 7,02 (dd, 1H, $J_{4-6} = 1,6 \text{ Hz}$, $J_{6-7} = 8,3 \text{ Hz}$, H_6), 4,95 (d, 2H, $J_{\text{NCH}_2\text{CCH}} = 2,6 \text{ Hz}$, NCH_2CCH), 3,53 (s, 2H, C_3CH_2), 2,90 (t, 1H, $J_{\text{NCH}_2\text{CCH}} = 2,5 \text{ Hz}$, CH), 2,41 (bs, 3H, C_5CH_3), 2,19 [s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$].

Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V.

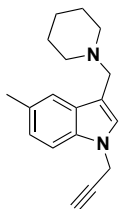
Pf 136–138 °C.

RMN de ^{13}C (D_2O + gotas de acetona- d_6 para calibración, 75,4 MHz) δ 165,0; 134,0; 131,4; 130,9; 128,0; 124,3; 118,0; 110,4; 102,2; 78,3; 74,1; 51,9; 41,5; 35,6; 20,4.

EMAR calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_2$ 227,1543 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$. Encontrado 227,1541 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$: C, 61,07; H, 6,63; N, 8,38. Encontrado: C, 60,69; H, 6,27; N, 8,75.

1.3.6.18. 5-metil-3-(piperidin-1-ilmetil)-1-(prop-2-in-1-il)-1H-indol (21)



Siguiendo el **Procedimiento General V**, **b3** (190 mg, 1,12 mmol) [piperidina (111 μl , 1,12 mmol), formaldehído (84 μl , 1,12 mmol), ácido acético glacial (0,5 ml)] dio lugar a **21** como un aceite que no requirió purificación (287 mg, 96 %).

RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7,48 (m, 1H, H_4), 7,27 (d, 1H, $J_{6-7} = 8,3 \text{ Hz}$, H_7), 7,13 (s, 1H, H_2), 7,07 (dd, 1H, $J_{4-6} = 2,1 \text{ Hz}$, $J_{6-7} = 8,3 \text{ Hz}$, H_6), 4,81 (d, 2H, $J_{\text{NCH}_2\text{CCH}} = 3,8 \text{ Hz}$, NCH_2CCH), 3,68 (s, 2H, C_3CH_2), 2,86 (t, 1H, $J_{\text{NCH}_2\text{CCH}} = 2,5 \text{ Hz}$, CH), 2,57–2,39 (m, 7H, H_2' , C_5CH_3), 1,68–1,51 (m, 4H, H_3'), 1,48–1,38 (m, 2H, H_4').

Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V.

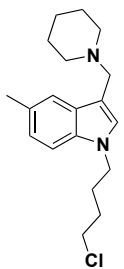
Pf 115–118 °C.

RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,4 MHz) δ 164,1; 134,0; 131,2; 129,0; 128,4; 123,6; 118,5; 110,2; 102,4; 78,8; 76,0; 51,0; 50,1; 35,4; 22,4; 21,4; 21,2.

EMAR calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_2$ 267,1856 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$. Encontrado 267,1853 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \cdot \text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$: C, 61,21; H, 7,19; N, 7,14. Encontrado: C, 61,51; H, 6,80; N, 7,02.

1.3.6.19. 1-(4-clorobutil)-5-metil-3-(piperidin-1-ilmetil)-1H-indol (22)



Seguendo el **Procedimiento General V**, **b5** (155 mg, 0,70 mmol) [piperidina (69 μl , 0,70 mmol), formaldehído (52 μl , 0,70 mmol), ácido acético glacial (1,5 ml)] dio lugar a **22** como un aceite amarillo que no requirió purificación (229 mg, > 99 %).

RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,50 (m, 1H, H4), 7,27 (d, 1H, $J_{6-7} = 8,4$ Hz, H7), 7,09 (s, 1H, H2), 6,97 (dd, 1H, $J_{4-6} = 1,4$ Hz, $J_{6-7} = 8,4$ Hz, H6), 4,16 [t, 2H, $J_{\text{NCH}_2\text{CH}_2} = 6,8$ Hz, $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_3\text{Cl}$], 3,60–3,53 (m, 4H, CH_2Cl y C3CH_2), 2,44–2,33 (m, 4H, H2'), 2,40 (s, 3H, C5CH_3), 1,93 (m, 2H, NCH_2CH_2), 1,72 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$), 1,56–1,47 (m, 4H, H3'), 1,45–1,36 (m, 2H, H4').

Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V.

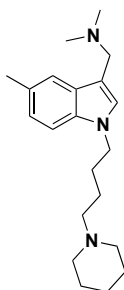
Pf 130–133 °C.

RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,4 MHz) δ 164,2; 134,2; 131,3; 128,5; 128,2; 123,4; 121,4; 118,5; 110,1; 51,3; 46,8; 44,9; 44,9; 29,4; 27,2; 24,7; 22,7; 21,2.

EMAR calc. para $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{ClN}_2$ 319,1936 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$. Encontrado 319,1933 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{ClN}_2 \cdot \text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$: C, 61,68; H, 7,15; N, 6,85. Encontrado: C, 61,31; H, 7,05; N, 6,65.

1.3.6.20. N,N-dimetil-1-(5-metil-1-(4-(piperidin-1-il)butil)-1H-indol-3-il)metanamina (23)



Seguendo el **Procedimiento General V**, **b6** (93 mg, 0,34 mmol) [dimetilamina (44 μl , 0,34 mmol), formaldehído (26 μl , 0,34 mmol), ácido acético glacial (0,6 ml)] dio lugar a **23** como un aceite amarillo que no requirió purificación (102 mg, 91 %).

RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,46 (m, 1H, H4), 7,28 (d, 1H, $J_{6-7} = 8,3$ Hz, H7), 7,11 (s, 1H, H2), 6,96 (dd, 1H, $J_{4-6} = 1,5$ Hz, $J_{6-7} = 8,3$ Hz, H6), 4,13 [t, 2H, $J_{\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{N}} = 7$ Hz, $\text{N}_1\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{N}$], 3,53 (s, 2H, C3CH_2), 2,40 (s, 3H, C5CH_3), 2,31–2,20 [m, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{N}$, H2'], 2,18 [s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$], 1,82 [m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{N}$], 1,54–1,44 (m, 4H, H3'), 1,44–1,34 (m, 2H, H4').

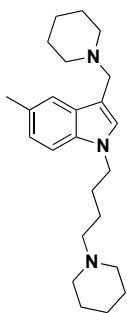
Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V.

Pf 146–149 °C.

RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,4 MHz) δ 164,6; 134,1; 131,6; 128,6; 128,1; 123,4; 118,4; 110,1; 102,3; 55,3; 52,0; 50,9; 45,1; 41,2; 26,7; 22,4; 21,4; 21,2; 20,7.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{21}\text{H}_{35}\text{N}_3 \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot 2\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$: C, 57,13; H, 7,48; N, 7,99. Encontrado: C, 57,49; H, 7,11; N, 7,61.

1.3.6.21. 5-metil-1-(4-(piperidin-1-il)butil)-3-(piperidin-1-ilmetil)-1H-indol (24)



Seguendo el **Procedimiento General V**, **b6** (120 mg, 0,44 mmol) [piperidina (44 μl , 0,44 mmol), formaldehído (33 μl , 0,44 mmol), ácido acético glacial (1,8 ml)] dio lugar a **24** como un aceite que no requirió purificación (162 mg, 96 %).

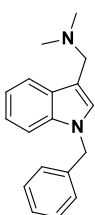
RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,48 (m, 1H, H4), 7,27 (d, 1H, $J_{6-7} = 8,3$ Hz, H7), 7,07 (s, 1H, H2), 6,95 (dd, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, $J_{6-7} = 8,3$ Hz, H6), 4,11 [t, 2H, $J = 10,4$ Hz, $\text{N}_1\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{N}$], 3,56 (d, 2H, $J_{\text{CH}_2\text{H}_4} = 1,0$ Hz, C_3CH_2), 2,44–2,32 (m, 4H, H2'), 2,40 (s, 3H, C_5CH_3), 2,30–2,16 [m, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{N}$, H2'], 1,80 [m, 2H, $\text{N}_1\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{N}$], 1,59–1,33 [m, 14H, $\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$, H3', H4', H3'', H4'']. Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V.

Pf 102–104 °C.

RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,4 MHz) δ 164,2; 134,0; 131,7; 128,6; 128,4; 123,4; 118,4; 110,1; 101,7; 55,4; 52,1; 51,3; 50,5; 45,1; 26,6; 22,5; 21,4; 21,4; 21,2; 20,8.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{N}_3 \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot 2\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$: C, 59,45; H, 7,66; N, 7,43. Encontrado: C, 59,82; H, 7,36; N, 7,18.

1.3.6.22. 1-(1-bencil-1H-indol-3-il)-N,N-dimetilmetanamina (26)



Seguendo el **Procedimiento General V**, **c1** (208 mg, 1 mmol) [dimetilamina (127 μl , 1 mmol), formaldehído (76 μl , 1 mmol), ácido acético glacial (2 ml)] dio lugar a **26** como un aceite amarillo que no requirió purificación (252 mg, 95 %).

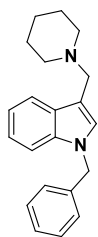
RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,76 (dm, 1H, $J_{4-5} = 9,0$ Hz, H4), 7,38–7,03 (m, 9H, Ar), 5,36 (s, 2H, NCH_2Ph), 3,62 (s, 2H, C_3CH_2), 2,23 [s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$]. Datos espectrales acordes con la literatura ^[190].

Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V.

Pf 164–166 °C.

RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,4 MHz) δ 164,1; 137,7; 135,9; 132,1; 128,6; 127,9; 127,5; 127,1; 121,9; 119,9; 119,0; 110,7; 103,1; 50,7; 49,2; 41,2.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2 \cdot \text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$: C, 67,78; H, 6,26; N, 7,90. Encontrado: C, 67,39; H, 6,20; N, 7,64.

1.3.6.23. 1-bencil-3-(piperidin-1-ilmetil)-1H-indol (27)

Siguiendo el **Procedimiento General V**, **c1** (189 mg, 0,91 mmol) [piperidina (90 μ l, 0,91 mmol), formaldehído (69 μ l, 0,91 mmol), ácido acético glacial (2 ml)] dio lugar a **27**. El crudo se purificó por cromatografía en columna flash de alúmina utilizando una mezcla de hexano/acetato de etilo (90/10) como eluyente, obteniéndose el producto puro como un aceite amarillo (230 mg, 83 %).

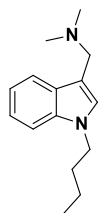
RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,76 (dm, 1H, $J_{4-5} = 7,8$ Hz, H4), 7,36–7,01 (m, 9H, Ar), 5,35 (s, 2H, NCH_2Ph), 3,63 (s, 2H, C3CH_2), 2,41 (m, 4H, H2'), 1,52 (m, 4H, H3'), 1,41 (m, 2H, H4'). Datos espectrales acordes con la literatura ^[202].

Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V.

Pf 181–183 °C.

RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,4 MHz) δ 164,1; 137,7; 135,9; 131,9; 128,6; 128,1; 127,5; 127,1; 121,9; 119,9; 119,0; 110,6; 51,3; 50,5; 49,2; 22,7; 21,5.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$: C, 67,11; H, 6,42; N, 6,70. Encontrado: C, 67,51; H, 6,42; N, 6,75.

1.3.6.24. 1-(1-butil-1H-indol-3-il)-N,N-dimetilmetanamina (28)

Siguiendo el **Procedimiento General V**, **c2** (174 mg, 1 mmol) [dimetilamina (127 μ l, 1,00 mmol), formaldehído (76 μ l, 1,00 mmol), ácido acético glacial (2 ml)] dio lugar a **28**. El crudo se purificó por cromatografía en columna flash de alúmina utilizando una mezcla de hexano/acetato de etilo (80/20) como eluyente, obteniéndose el producto puro como un aceite amarillo (79 mg, 34 %).

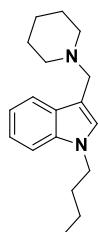
RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,67 (dm, 1H, $J_{4-5} = 8,1$ Hz, H4), 7,37 (dm, 1H, $J_{6-7} = 8,1$ Hz, H7), 7,15 (m, 2H, H5 y H6), 7,01 (ddd, 1H, $J_{4-5} = 8,1$ Hz, $J_{5-6} = 7,8$ Hz, H5), 4,16 (t, 2H, $J_{\text{NCH}_2\text{CH}_2} = 6,9$ Hz, NCH_2CH_2), 3,56 (s, 2H, C3CH_2), 2,19 [s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$], 1,80 (m, 2H, NCH_2CH_2), 1,33 (m, 2H, CH_2CH_3), 0,92 (t, 3H, $J_{\text{CH}_2\text{CH}_3} = 7,2$ Hz, CH_3).

Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V.

Pf 142–144 °C.

RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,4 MHz) δ 163,4; 135,8; 131,6; 127,7; 121,7; 119,7; 118,8; 110,3; 102,3; 50,8; 45,3; 41,1; 31,7; 19,4; 13,5.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$: C, 60,34; H, 7,74; N, 8,28. Encontrado: C, 60,54; H, 7,62; N, 7,97.

1.3.6.25. 1-butil-3-(piperidin-1-ilmetil)-1H-indol (29)

Siguiendo el **Procedimiento General V**, **c2** (170 mg, 0,98 mmol) [piperidina (97 μ l, 0,98 mmol), formaldehído (74 μ l, 0,98 mmol), ácido acético glacial (2 ml)] dio lugar

a **29**. El crudo se purificó por cromatografía en columna flash de alúmina utilizando una mezcla de hexano/acetato de etilo (80/20) como eluyente, obteniéndose el producto puro como un aceite amarillo (209 mg, 79 %).

RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,73 (dm, 1H, $J_{4-5} = 7,8$ Hz, H4), 7,36 (dm, 1H, $J_{6-7} = 8,1$ Hz, H7), 7,14 (m, 2H, H2 y H6), 7,02 (ddd, 1H, $J_{4-5} = 7,8$ Hz, $J_{5-6} = 7,8$ Hz, H5), 4,12 (t, 2H, $J_{\text{NCH}_2\text{CH}_2} = 7,1$ Hz, NCH_2CH_2), 3,62 (s, 2H, C3CH_2), 2,41 (m, 4H, H2'), 1,78 (m, 2H, NCH_2CH_2), 1,53 (m, 4H, H3'), 1,43 (m, 2H, H4'), 1,33 (m, 2H, CH_2CH_3), 0,92 (t, 3H, $J_{\text{CH}_2\text{CH}_3} = 7,2$ Hz, CH_3).

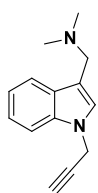
Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V.

Pf 156–158 °C.

RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,4 MHz) δ 164,4; 135,8; 131,5; 128,0; 121,7; 119,7; 118,9; 110,3; 101,2; 51,2; 50,5; 45,4; 31,8; 22,6; 21,5; 19,5; 13,5.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_2 \cdot \text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$: C, 66,64; H, 7,83; N, 7,77. Encontrado: C, 66,28; H, 7,68; N, 7,64.

1.3.6.26. *N,N*-dimetil-1-(1-(prop-2-in-1-il)-1H-indol-3-il)metanamina (30)



Seguendo el **Procedimiento General V**, **c3** (167 mg, 1,08 mmol) [dimetilamina (136 μl , 1,08 mmol), formaldehído (81 μl , 1,08 mmol), ácido acético glacial (2 ml)] dio lugar a **30** como un aceite amarillo que no requirió purificación (228 mg, > 99 %).

RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,71 (dm, 1H, $J_{4-5} = 8,1$ Hz, H4), 7,47 (dm, 1H, $J_{6-7} = 8,4$ Hz, H7), 7,26 (s, 1H, H2), 7,20 (ddd, 1H, $J_{4-6} = 1,2$ Hz, $J_{5-6} = 7,8$ Hz, $J_{6-7} = 8,4$ Hz, H6), 7,07 (ddd, 1H, $J_{5-7} = 1,2$ Hz, $J_{4-5} = 8,1$ Hz, $J_{5-6} = 7,8$ Hz, H5), 5,02 (d, 2H, $J_{\text{NCH}_2\text{CCH}} = 2,4$ Hz, NCH_2CCH), 3,59 (s, 2H, C3CH_2), 2,93 (t, 1H, $J_{\text{NCH}_2\text{CCH}} = 2,4$ Hz, CH), 2,21 [s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$].

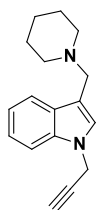
Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V.

Pf 168–170 °C.

RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,4 MHz) δ 164,2; 135,6; 131,0; 127,9; 122,1; 120,2; 119,0; 110,5; 103,8; 78,8; 76,0; 50,8; 41,3; 35,3.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2 \cdot \text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$: C, 63,56; H, 6,00; N, 9,27. Encontrado: C, 63,73; H, 6,03; N, 8,94.

1.3.6.27. 3-(piperidin-1-ilmetil)-1-(prop-2-in-1-il)-1H-indol (31)



Seguendo el **Procedimiento General V**, **c3** (118 mg, 0,76 mmol) [piperidina (75 μl , 0,76 mmol), formaldehído (58 μl , 0,76 mmol), ácido acético glacial (2 ml)] dio lugar a **31**. El crudo se purificó por cromatografía en columna flash de alúmina utilizando una mezcla de hexano/acetato de etilo (80/20) como eluyente, obteniéndose el

producto puro como un aceite amarillo (191 mg, > 99 %).

RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,75 (dm, 1H, $J_{4-5} = 8,1$ Hz, H4), 7,46 (dm, 1H, $J_{6-7} = 8,1$ Hz, H7), 7,22 (s, 1H, H2), 7,19 (ddd, 1H, $J_{5-6} = 7,8$ Hz, $J_{6-7} = 8,1$ Hz, H6), 7,07 (ddd, 1H, $J_{4-5} = 8,1$ Hz, $J_{5-6} = 7,8$ Hz, H5), 5,01 (d, 2H, $J_{\text{NCH}_2\text{CCH}} = 2,4$ Hz, NCH_2CCH), 3,61 (s, 2H, C3CH_2), 2,92 (t, 1H, $J_{\text{NCH}_2\text{CCH}} = 2,4$ Hz, CH), 2,40 (m, 4H, $\text{H2}'$), 1,53 (m, 4H, $\text{H3}'$), 1,41 (m, 2H, $\text{H4}'$).

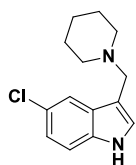
Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V.

Pf 162–164 °C.

RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,4 MHz) δ 164,1; 135,5; 131,1; 128,2; 122,1; 120,2; 119,0; 110,5; 103,2; 78,8; 76,1; 51,3; 50,3; 35,3; 22,6; 21,4.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$: C, 63,32; H, 6,71; N, 7,77. Encontrado: C, 63,09; H, 6,51; N, 7,80.

1.3.6.28. 5-cloro-3-(piperidin-1-ilmetil)-1H-indol (32)



Seguendo el **Procedimiento General V**, **d** (150 mg, 0,97 mmol) [piperidina (96 μl , 0,97 mmol), formaldehído (73 μl , 0,97 mmol), ácido acético glacial (2 ml)] dio lugar a **32**. El crudo se purificó por cromatografía en columna flash de alúmina utilizando una mezcla de hexano/acetato de etilo (50/50) como eluyente, obteniéndose el producto puro como un aceite amarillo (190 mg, 79 %).

RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 10,31 (bs, 1H, NH), 7,74 (d, 1H, $J_{4-6} = 1,8$ Hz, H4), 7,38 (d, 1H, $J_{6-7} = 8,4$ Hz, H7), 7,26 (s, 1H, H2), 7,09 (dd, 1H, $J_{4-6} = 1,8$ Hz, $J_{6-7} = 8,4$ Hz, H6), 3,60 (s, 2H, C3CH_2), 2,40 (m, 4H, $\text{H2}'$), 1,53 (m, 4H, $\text{H3}'$), 1,42 (m, 2H, $\text{H4}'$).

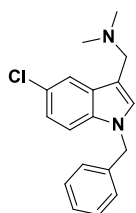
Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V.

Pf 193–195 °C.

RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,4 MHz) δ 164,2; 134,4; 130,3; 128,7; 124,4; 121,7; 118,0; 113,4; 102,9; 51,2; 50,3; 22,6; 21,4.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{ClN}_2 \cdot \text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$: C, 56,72; H, 5,65; N, 8,27. Encontrado: C, 56,91; H, 5,72; N, 7,96.

1.3.6.29. 1-(1-bencil-5-cloro-1H-indol-3-il)-N,N-dimetilmetanamina (33)



Seguendo el **Procedimiento General V**, **d1** (219 mg, 0,91 mmol) [dimetilamina (115 μl , 0,91 mmol), formaldehído (68 μl , 0,91 mmol), ácido acético glacial (2 ml)] dio lugar a **33** como un aceite amarillo que no requirió purificación (269 mg, > 99 %).

RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,79 (bd, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, H4), 7,36–7,14 (m, 7H, Ar), 7,11 (dd, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, $J_{6-7} = 8,1$ Hz, H6), 5,34 (s, 2H, NCH_2Ph), 3,57 (s, 2H, C3CH_2), 2,22 [s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$].

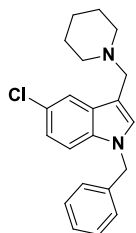
Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V.

Pf 177–179 °C.

RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,4 MHz) δ 164,3; 137,4; 135,7; 134,4; 133,5; 129,1; 128,6; 127,6; 127,0; 124,9; 122,0; 118,5; 50,6; 49,4; 41,3.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{ClN}_2 \cdot \text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$: C, 61,78; H, 5,44; N, 7,20. Encontrado: C, 61,67; H 5,51; N, 6,99.

1.3.6.30. 1-bencil-5-cloro-3-(piperidin-1-ilmetil)-1H-indol (34)



Seguendo el **Procedimiento General V**, **d1** (219 mg, 0,91 mmol) [piperidina (90 μl , 0,91 mmol), formaldehído (68 μl , 0,91 mmol), ácido acético glacial (2 ml)] dio lugar a **34**. El crudo se purificó por cromatografía en columna flash de alúmina utilizando una mezcla de hexano/acetato de etilo (90/10) como eluyente, obteniéndose el producto puro como un aceite amarillo (278 mg, 91 %).

RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,77 (bd, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, H4), 7,37–7,16 (m, 7H, Ar), 7,08 (dd, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H6), 5,38 (s, 2H, NCH_2Ph), 3,60 (s, 2H, C3CH_2), 2,39 (m, 4H, H2'), 1,53 (m, 4H, H3'), 1,42 (m, 2H, H4').

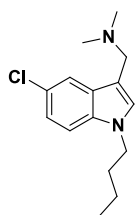
Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V.

Pf 198–200 °C.

RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,4 MHz) δ 164,1; 137,4; 134,4; 133,4; 129,3; 128,6; 127,6; 127,1; 124,8; 121,9; 118,5; 112,3; 51,4; 50,3; 49,4; 22,7; 21,6.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{ClN}_2 \cdot \text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$: C, 64,41; H, 5,88; N, 6,53. Encontrado: C, 64,30; H, 5,79; N, 6,29.

1.3.6.31. 1-(1-butil-5-cloro-1H-indol-3-il)-N,N-dimetilmetanamina (35)



Seguendo el **Procedimiento General V**, **d2** (168 mg, 0,81 mmol) [dimetilamina (102 μl , 0,81 mmol), formaldehído (61 μl , 0,81 mmol), ácido acético glacial (2 ml)] dio lugar a **35** como un aceite amarillo que no requirió purificación (210 mg, > 99 %).

RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,71 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, H4), 7,37 (d, 1H, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H7), 7,21 (s, 1H, H2), 7,11 (dd, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H6), 4,14 (t, 2H, $J_{\text{NCH}_2\text{CH}_2} = 7,2$ Hz, NCH_2CH_2), 3,53 (s, 2H, C3CH_2), 2,18 [s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$], 1,78 (m, 2H, NCH_2CH_2), 1,29 (m, 2H, CH_2CH_3), 0,93 (t, 3H, $J_{\text{CH}_2\text{CH}_3} = 7,2$ Hz, CH_3).

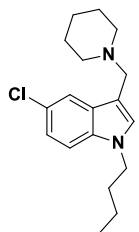
Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V.

Pf 150–152 °C.

RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,4 MHz) δ 163,7; 134,3; 133,2; 128,9; 124,7; 121,7; 118,3; 112,0; 102,5; 50,5; 45,6; 31,7; 19,3; 13,5.

Anal. Elem. calc. para $C_{15}H_{21}ClN_2 \cdot H_2O \cdot C_2H_2O_4$: C, 54,76; H, 6,76; N, 7,51. Encontrado: C, 54,48; H, 6,32; N, 7,83.

1.3.6.32. 1-butil-5-cloro-3-(piperidin-1-ilmetil)-1H-indol (36)



Siguiendo el **Procedimiento General V**, **d2** (212 mg, 1,02 mmol) [piperidina (101 μ l, 1,02 mmol), formaldehído (76 μ l, 1,02 mmol), ácido acético glacial (2 ml)] dio lugar a **36**. El crudo se purificó por cromatografía en columna de alúmina utilizando una mezcla de hexano/acetato de etilo (80/20) como eluyente (287 mg, 92 %).

RMN de 1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,73 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, H4), 7,38 (d, 1H, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H7), 7,20 (s, 1H, H2), 7,10 (dd, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H6), 4,14 (t, 2H, $J_{NCH_2CH_2} = 7,2$ Hz, NCH_2CH_2), 3,57 (s, 2H, $C3CH_2$), 2,37 (m, 4H, H2'), 1,78 (m, 2H, NCH_2CH_2), 1,52 (m, 4H, H3'), 1,42 (m, 2H, H4'), 1,29 (m, 2H, CH_2CH_3), 0,91 (t, 3H, $J_{CH_2CH_3} = 7,5$ Hz, CH_3).

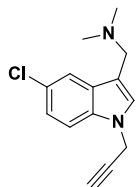
Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V.

Pf 184–186 °C.

RMN de ^{13}C (D_2O + gotas de acetona- d_6 para calibración, 75,4 MHz) δ 165,5; 134,5; 133,3; 128,7; 125,5; 122,3; 117,7; 112,0; 100,9; 52,1; 51,1; 46,0; 31,3; 22,8; 21,0; 19,3; 12,8.

Anal. Elem. calc. para $C_{18}H_{25}ClN_2 \cdot C_2H_2O_4$: C, 60,83; H, 6,89; N, 7,09. Encontrado: C, 60,48; H, 6,75; N, 7,01.

1.3.6.33. 1-(5-cloro-1-(prop-2-in-1-il)-1H-indol-3-il)-N,N-dimetilmetanamina (37)



Siguiendo el **Procedimiento General V**, **d3** (121 mg, 0,64 mmol) [dimetilamina (81 μ l, 0,64 mmol), formaldehído (48 μ l, 0,64 mmol), ácido acético glacial (2 ml)] dio lugar a **37** como un aceite amarillo que no requirió purificación (149 mg, 95 %).

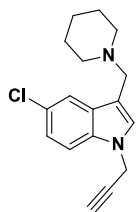
RMN de 1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,72 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, H4), 7,48 (d, 1H, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H7), 7,32 (s, 1H, H2), 7,17 (dd, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H6), 5,04 (d, 2H, $J_{NCH_2CCH} = 2,4$ Hz, NCH_2CCH), 3,54 (s, 2H, $C3CH_2$), 2,96 (t, 1H, $J_{NCH_2CCH} = 2,4$ Hz, CH), 2,19 [s, 6H, $N(CH_3)_2$].

Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V.

Pf 170–172 °C.

RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,4 MHz) δ 164,1; 134,1; 132,5; 129,1; 125,1; 122,1; 118,6; 112,2; 104,1; 78,5; 76,3; 50,7; 41,5; 35,6.

Anal. Elem. calc. para $C_{14}H_{15}ClN_2 \cdot C_2H_2O_4$: C, 57,06; H, 5,09; N, 8,32. Encontrado: C, 56,73; H, 5,05; N, 8,03.

1.3.6.34. 5-cloro-3-(piperidin-1-ilmetil)-1-(prop-2-in-1-il)-1H-indol (38)

Siguiendo el **Procedimiento General V**, **d3** (117 mg, 0,62 mmol) [piperidina (61 μ l, 0,62 mmol), formaldehído (47 μ l, 0,62 mmol), ácido acético glacial (2 ml)] dio lugar a **38**. El crudo se purificó por cromatografía en columna flash de alúmina utilizando una mezcla de hexano/acetato de etilo (50/50) como eluyente, obteniéndose el producto puro como un aceite amarillo (175 mg, > 99 %).

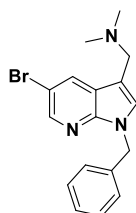
RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,76 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, H4), 7,47 (d, 1H, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H7), 7,29 (s, 1H, H2), 7,17 (dd, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H6), 5,03 (d, 2H, $J_{\text{NCH}_2\text{CCH}} = 2,4$ Hz, NCH_2CCH), 3,57 (s, 2H, C_3CH_2), 2,95 (t, 1H, $J_{\text{NCH}_2\text{CCH}} = 2,4$ Hz, CH), 2,38 (m, 4H, H2'), 1,52 (m, 4H, H3'), 1,41 (m, 2H, H4').

Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V.

Pf 187–189 °C.

RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,4 MHz) δ 164,3; 134,1; 132,7; 129,4; 125,2; 122,1; 118,6; 112,2; 103,3; 78,5; 76,4; 51,3; 49,9; 35,6; 22,6; 21,5.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{ClN}_2 \cdot \text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$: C, 60,56; H, 5,62; N, 7,43. Encontrado: C, 60,14; H, 5,73; N, 7,14.

1.3.6.35. 1-(1-bencil-5-bromo-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il)-N,N-dimetilmetanamina (39)

Siguiendo el **Procedimiento General V**, **e1** (134 mg, 0,47 mmol) [dimetilamina (118 μ l, 0,47 mmol), formaldehído (70 μ l, 0,47 mmol), ácido acético glacial (2,5 ml)] dio lugar a **39** como un aceite verdoso que no requirió purificación (161 mg, > 99 %).

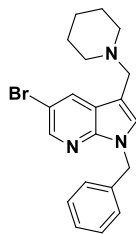
RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 8,32 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, H6), 8,24 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, H4), 7,41 (s, 1H, H2), 7,27 (m, 5H, Ar), 5,47 (s, 2H, NCH_2Ph), 3,52 (s, 2H, C_3CH_2), 2,17 [s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$].

Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V.

Pf 203–205 °C.

RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,4 MHz) δ 175,7; 155,2; 154,0; 146,9; 144,1; 140,5; 139,0; 138,1; 137,2; 132,1; 122,3; 111,3; 61,6; 58,4; 51,7.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{BrN}_3 \cdot \text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$: C, 52,55; H, 4,64; N, 9,68. Encontrado: C, 52,42; H, 4,64; N, 9,41.

1.3.6.36. 1-bencil-5-bromo-3-(piperidin-1-ilmetil)-1H-pirrol[2,3-b]piridina (40)

Siguiendo el **Procedimiento General V**, **e1** (280 mg, 0,98 mmol) [piperidina (96 μ l, 0,98 mmol), formaldehído (73 μ l, 0,98 mmol), ácido acético glacial (2,5 ml)] dio lugar a **40**. El crudo se purificó por cromatografía en columna flash de

alúmina utilizando una mezcla de hexano/acetato de etilo (80/20) como eluyente, obteniéndose el producto puro como un aceite amarillo (372 mg, > 99 %).

RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 8,31 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,4$ Hz, H6), 8,27 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,4$ Hz, H4), 7,38 (s, 1H, H2), 7,27 (m, 5H, Ar), 5,46 (s, 2H, NCH_2Ph), 3,55 (s, 2H, C_3CH_2), 2,35 (m, 4H, H2'), 1,50 (m, 4H, H3'), 1,38 (m, 2H, H4').

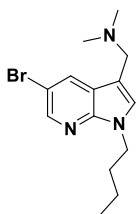
Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V.

Pf 214–216 °C.

RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,4 MHz) δ 164,0; 145,4; 143,4; 137,5; 133,3; 130,0; 128,6; 127,6; 127,3; 121,9; 111,8; 51,5; 50,2; 47,5; 22,8; 21,6.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{BrN}_3 \cdot \text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$: C, 55,71; H, 5,10; N, 8,86. Encontrado: C, 55,58; H, 5,05; N, 8,52.

1.3.6.37. 1-(5-bromo-1-butil-1H-pirroló[2,3-b]piridin-3-il)-N,N-dimetilmetanamina (41)



Siguiendo el **Procedimiento General V**, **e2** (174 mg, 0,69 mmol) [dimetilamina (87 μl , 0,69 mmol), formaldehído (52 μl , 0,69 mmol), ácido acético glacial (1,7 ml)] dio lugar a **41** como un aceite que no requirió purificación (198 mg, 93 %).

RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 8,27 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,4$ Hz, H6), 8,19 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,4$ Hz, H4), 7,38 (s, 1H, H2), 4,25 (t, 2H, $J_{\text{NCH}_2\text{CH}_2} = 6,9$ Hz, NCH_2CH_2), 3,52 (s, 2H, C_3CH_2), 2,17 [s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$], 1,81 (m, 2H, NCH_2CH_2), 1,27 (m, 2H, CH_2CH_3), 0,93 (t, 3H, $J_{\text{CH}_2\text{CH}_3} = 7,5$ Hz, CH_3).

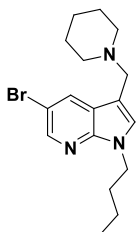
Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V.

Pf 181–183 °C.

RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,4 MHz) δ 164,2; 145,5; 143,1; 133,3; 129,9; 121,6; 111,5; 101,8; 50,9; 43,9; 41,5; 31,6; 19,3; 13,5.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{BrN}_3 \cdot \text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$: C, 48,01; H, 5,54; N, 10,50. Encontrado: C, 48,43; H, 5,46; N, 10,35.

1.3.6.38. 5-bromo-1-butil-3-(piperidin-1-ilmetil)-1H-pirroló[2,3-b]piridina (42)



Siguiendo el **Procedimiento General V**, **e2** (125 mg, 0,49 mmol) [piperidina (49 μl , 0,49 mmol), formaldehído (37 μl , 0,49 mmol), ácido acético glacial (1,8 ml)] dio lugar a **42**. El crudo se purificó por cromatografía en columna flash de alúmina utilizando una mezcla de hexano/acetato de etilo (80/20) como eluyente, obteniéndose el producto puro como un aceite amarillo (175 mg, > 99 %).

RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 8,27 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, H6), 8,22 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, H4), 7,35 (s, 1H, H2), 4,24 (t, 2H, $J_{\text{NCH}_2\text{CH}_2} = 7,2$ Hz, NCH_2CH_2), 3,55 (s, 2H, C_3CH_2), 2,35 (m,

4H, H2'), 1,81 (m, 2H, NCH₂CH₂), 1,51 (m, 4H, H3'), 1,40 (m, 2H, H4'), 1,28 (m, 2H, CH₂CH₃), 0,90 (t, 3H, *J*_{CH₂CH₃} = 7,2 Hz, CH₃).

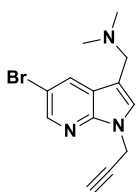
Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V.

Pf 208–210 °C.

RMN de ¹³C (D₂O + gotas de acetona-*d*₆ para calibración, 75,4 MHz) δ 215,8; 145,4; 143,7; 134,4; 130,7; 122,7; 112,1; 100,4; 52,6; 51,3; 45,2; 31,8; 23,2; 21,4; 19,7; 13,2.

Anal. Elem. calc. para C₁₇H₂₄BrN₃·C₂H₂O₄: C, 51,83; H, 5,95; N, 9,54. Encontrado: C, 51,95; H, 5,81; N, 9,46.

1.3.6.39. 1-(5-bromo-1-(prop-2-in-1-il)-1H-pirrololo[2,3-b]piridin-3-il)-N,N-dimetilmetanamina (43)



Seguendo el **Procedimiento General V**, **e3** (143 mg, 0,61 mmol) [dimetilamina (77 µl, 0,61 mmol), formaldehído (46 µl, 0,61 mmol), ácido acético glacial (2 ml)] dio lugar a **43**. El crudo se purificó por cromatografía en columna flash de alúmina utilizando una mezcla de hexano/acetato de etilo (50/50) como eluyente, obteniéndose el producto puro como un aceite amarillo (114 mg, 64 %).

RMN de ¹H (acetona-*d*₆, 300 MHz) δ 8,31 (d, 1H, *J*₄₋₆ = 2,4 Hz, H6), 8,24 (d, 1H, *J*₄₋₆ = 2,4 Hz, H4), 7,35 (s, 1H, H2), 5,10 (d, 2H, *J*_{NCH₂CCH} = 2,4 Hz, NCH₂CCH), 3,56 (s, 2H, C3CH₂), 2,93 (t, 1H, *J*_{NCH₂CCH} = 2,4 Hz, CH), 2,19 [s, 6H, N(CH₃)₂].

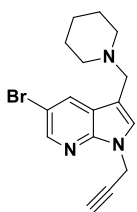
Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V.

Pf 179–181 °C.

RMN de ¹³C (DMSO-*d*₆, 75,4 MHz) δ 164,1; 145,0; 143,6; 132,6; 130,3; 121,8; 112,1; 103,1; 78,7; 75,9; 50,8; 41,7; 33,7.

Anal. Elem. calc. para C₁₃H₁₄BrN₃·C₂H₂O₄: C, 47,14; H, 4,22; N, 10,99. Encontrado: C, 47,22; H, 4,34; N, 10,55.

1.3.6.40. 5-bromo-3-(piperidin-1-ilmetil)-1-(prop-2-in-1-il)-1H-pirrololo[2,3-b]piridina (44)



Seguendo el **Procedimiento General V**, **e3** (113 mg, 0,48 mmol) [piperidina (47 µl, 0,48 mmol), formaldehído (36 µl, 0,48 mmol), ácido acético glacial (2 ml)] dio lugar a **44**. El crudo se purificó por cromatografía en columna flash de alúmina utilizando una mezcla de hexano/acetato de etilo (1/99) como eluyente, obteniéndose el producto puro como un aceite amarillo (143 mg, 89 %).

RMN de ¹H (acetona-*d*₆, 300 MHz) δ 8,31 (d, 1H, *J*₄₋₆ = 2,1 Hz, H6), 8,28 (d, 1H, *J*₄₋₆ = 2,1 Hz, H4), 7,50 (s, 1H, H2), 5,10 (d, 2H, *J*_{NCH₂CCH} = 2,4 Hz, NCH₂CCH), 3,60 (s, 2H, C3CH₂), 2,92 (t, 1H, *J*_{NCH₂CCH} = 2,4 Hz, CH), 2,38 (m, 4H, H2'), 1,53 (m, 4H, H3'), 1,42 (m, 2H, H4').

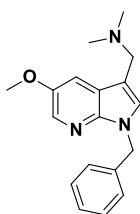
Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V.

Pf 198–200 °C.

RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,4 MHz) δ 163,9; 145,0; 143,4; 132,6; 130,1; 122,0; 112,0; 102,7; 78,6; 75,9; 51,5; 50,2; 33,6; 22,8; 21,6.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{BrN}_3 \cdot \text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$: C, 51,20; H, 4,77; N, 9,95. Encontrado: C, 50,81; H, 4,74; N, 9,68.

1.3.6.41. 1-(1-bencil-5-metoxi-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il)-N,N-dimetilmetanamina (45)



Seguendo el **Procedimiento General V**, **f1** (73 mg, 0,31 mmol) [dimetilamina (39 μl , 0,31 mmol), formaldehído (23 μl , 0,31 mmol), ácido acético glacial (1,5 ml)] dio lugar a **45** como un aceite amarillo que no requirió purificación (67 mg, 74 %).

RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 8,03 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,7$ Hz, H6), 7,63 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,7$ Hz, H4), 7,33 (s, 1H, H2), 7,27 (m, 5H, Ar), 5,45 (s, 2H, NCH_2Ph), 3,86 (s, 3H, CH_3), 3,54 (s, 2H, C3CH_2), 2,18 [s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$].

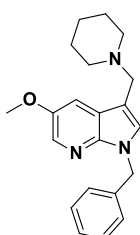
Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V.

Pf 187–189 °C.

RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,4 MHz) δ 164,3; 151,5; 142,3; 138,0; 133,8; 132,3; 128,6; 127,4; 127,2; 119,9; 110,3; 101,7; 56,1; 51,0; 47,4; 41,3.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_3 \cdot \text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$: C, 62,33; H, 6,01; N, 10,90. Encontrado: C, 62,10; H, 5,92; N, 10,68.

1.3.6.42. 1-bencil-5-metoxi-3-(piperidin-1-ilmetil)-1H-pirrol[2,3-b]piridina (46)



Seguendo el **Procedimiento General V**, **f1** (60 mg, 0,25 mmol) [piperidina (25 μl , 0,25 mmol), formaldehído (19 μl , 0,25 mmol), ácido acético glacial (2 ml)] dio lugar a **46**. El crudo se purificó por cromatografía en columna flash de alúmina utilizando una mezcla de hexano/acetato de etilo (50/50) como eluyente, obteniéndose el producto puro como un aceite amarillo (66 mg, 78 %).

RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 8,02 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,4$ Hz, H6), 7,67 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,4$ Hz, H4), 7,30 (s, 1H, H2), 7,27 (m, 5H, Ar), 5,44 (s, 2H, NCH_2Ph), 3,86 (s, 3H, CH_3), 3,57 (s, 2H, C3CH_2), 2,37 (m, 4H, $\text{H2}'$), 1,52 (m, 4H, $\text{H3}'$), 1,40 (m, 2H, $\text{H4}'$).

Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el procedimiento general V.

Pf 195–197 °C.

RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,4 MHz) δ 164,3; 151,5; 142,3; 138,0; 133,7; 132,4; 128,6; 127,5; 127,3; 120,2; 110,3; 56,1; 51,2; 50,4; 47,5; 22,7; 21,5.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O} \cdot \text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$: C, 64,93; H, 6,40; N, 9,88. Encontrado: C, 64,55; H, 6,33; N, 9,60.

1.4. Estudio computacional

La estructura y el análisis conformacional de los compuestos estudiados se obtuvieron por el método Monte Carlo con el programa Spartan10 (Wavefunction; Irvine, EE.UU.). En primer lugar, se dibujaron las moléculas neutras y se optimizaron por métodos de mecánica molecular (*conformer distribution*), los cuales sólo utilizan electrones de la última capa de valencia para los cálculos de energía conformacional y diseño de confórmers. El confórmer de menor energía se optimizó consecutivamente por cálculos *ab initio* con la base Hartree-Fock 6-31G*, y el confórmer resultante, de energía más negativa, se utilizó para los estudios de *docking* molecular.

La estructura 3D de la proteína PP2A co-cristalizada con AO se obtuvo de *Protein Data Bank* (PDB ID: 2IE4; www.rcsb.org)^[71]. Esta estructura tiene una resolución de 3,5 Å y está formada por la subunidad catalítica C α , la subunidad estructural A α y el inhibidor AO, el cual se encuentra coordinado en el sitio activo de la enzima. Para reducir el tamaño del cálculo matemático, las moléculas de agua de co-cristalización se eliminaron del complejo.

Los cálculos de *docking* molecular para PP2A y los compuestos seleccionados se obtuvieron mediante el programa Molegro Virtual Docker 3.0^[203]. Se realizó un *docking* dirigido hacia la cavidad en la que el AO se une a la proteína, permitiendo al ligando buscar su mejor pose dentro ella. Se exploraron hasta 10 poses diferentes de los ligandos y se clasificaron en función de sus energías. Las poses con mejor energía y conformación se seleccionaron para un análisis 3D pormenorizado. Se utilizó MolDock Score como algoritmo de cálculo, el cual se adaptó del algoritmo Differential Evolution. Se utilizó el programa PoseView para la visión 3D del mejor confórmer, en su mejor pose, y los aminoácidos con los que interacciona, así como para la representación de los resultados.

1.5. Cálculo de parámetros fisicoquímicos

Los valores de ClogP, logD a pH 7,4, el área de superficie polar (PSA, por sus siglas en inglés) y el pK_a se obtuvieron con el programa Marvin Sketch 6.1.0.

2. MATERIALES Y MÉTODOS DE EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA

A continuación, se describen los protocolos y materiales empleados a lo largo de esta Memoria de Tesis relacionados con la química médica.

2.1. *Materiales utilizados*

Medio esencial mínimo de Eagle (EMEM, por sus siglas en inglés), medio F12, penicilina/estreptomicina, gentamicina, L-glutamina, tripsina/EDTA, bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT), memantina, rotenona, melatonina, nifedipino, AO, veratridina, tetrodotoxina (TTX), NaVO₃ y DMSO fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Madrid, España). La oligomicina A se obtuvo de Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Alemania) y la ω -conotoxina MVIIC de Peptide Institute Inc. (Osaka, Japón). Los aminoácidos no esenciales, el suero fetal bovino (SFB), el medio Neurobasal y el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés) se obtuvieron de Gibco (Madrid, España). El kit de fosfato de *p*-nitrofenol (*p*NPP) para medir la actividad fosfatasa fue suministrado por VWR (Barcelona, España), y la sonda FLUO-4/AM por Thermo Life Technologies (Oregon, EE.UU.). Todo el material estéril (frascos de cultivo, tubos *Falcon*, pipetas y placas multipocillo) se obtuvo de Corning (Madrid, España).

2.2. *Mantenimiento de las células en cultivo*

Los cultivos celulares se mantuvieron en un incubador de células a 37 °C con una atmósfera constante de 95 % de aire y 5 % de CO₂, saturada de humedad (91 %). Todos los procedimientos se realizaron en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar.

En los experimentos que involucraron a animales se hicieron todos los esfuerzos posibles para minimizar el número utilizado y su sufrimiento, siguiendo la directiva publicada por la Unión Europea para estos fines (2010/63/EU), así como las normas aprobadas por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid (RD53/2013).

2.2.1. *Línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y*

En 1970, J.L. Biedler desarrolló la línea celular SH-SY5Y, como un subclón de la línea SK-N-SH, y estableció las condiciones básicas para su cultivo (Figura 22) ^[204]. Proviene de un neuroblastoma metastásico de una niña de 4 años, por lo que presentan un fenotipo neuronal, y pueden ser diferenciadas con diferentes sustancias, como el ácido retinoico ^[205]. Estas células en

cultivo son mayoritariamente adherentes, crecen en monocapa con tendencia a agregarse y presentan una morfología tipo epitelial con pequeñas prolongaciones. Este modelo celular ha sido ampliamente utilizado para experimentos *in vitro* que requieran células de tipo neuronal. Además, al ser de origen humano, expresan una serie de proteínas específicas que no están presentes en cultivos primarios de roedores. Las células SH-SY5Y no diferenciadas presentan actividad Tyr-hidroxilasa ^[206], transportador de dopamina y sus receptores tipos 2 y 3 ^[207], receptores muscarínicos y nicotínicos ^[208], canales de Ca^{2+} , Na^{+} y K^{+} dependientes de voltaje ^[209, 210], receptores purinérgicos P2X7 ^[211] y receptores opioides ^[212].

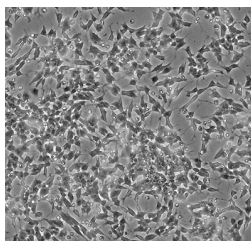


Figura 22. Células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

Estas células se encuentran almacenadas en criotubos en un tanque con N_2 líquido ($-173\text{ }^{\circ}\text{C}$). Para su descongelación, que debe ser lo más rápida posible, se resuspende el volumen del criotubo en 10 ml de medio de cultivo precalentado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. El medio de crecimiento para la línea celular SH-SY5Y consiste en una mezcla (1:1) de medios EMEM y F12, enriquecida con SFB al 10 % (previamente inactivado por calor, a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min), penicilina /estreptomicina (100 UI/ml y 100 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente), aminoácidos no esenciales (0,1 mM), NaHCO_3 (23 mM) y piruvato sódico (1 mM). A continuación, se centrifugan las células a 800 rpm durante 10 min, el precipitado se resuspende en medio de cultivo fresco y se traspassa a un frasco de cultivo. Así, las células se mantuvieron en cultivo en monocapa en frascos estériles de 75-150 cm^2 , sustituyéndoles el medio de cultivo por medio fresco cada 3-4 días. Cuando las células alcanzaron una confluencia mayor del 80 %, se realizaron los pases y las siembras en placas, utilizando la tripsina/EDTA como proteasa para romper las uniones de las células entre ellas y al plástico de los frascos de cultivo. Tras una centrifugación a 800 rpm durante 10 min, las células se resuspendieron en medio fresco al 10 % de SFB y se traspasaron a frascos de cultivo o se sembraron en placas. Para su almacenamiento, se depositaron en los criotubos suspendidas en medio celular con un 10 % de SFB y un 10 % de DMSO (actuando el DMSO como agente crioprotector) y se congelaron lentamente (1 h a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, 24 h a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y finalmente traspase al tanque de N_2 a $-173\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Para los ensayos de medidas de Ca^{2+} citosólico, las células se sembraron en placas negras con fondo transparente de 96 pocillos a una densidad de 50 000 células por pocillo. Para los experimentos de neuroprotección y medida de actividad fosfatasa, las células se sembraron en

placas de 48 pocillos a una densidad de 70 000 células por pocillo. Las células utilizadas para los experimentos se encontraron en número bajo de pase (8 a 20).

2.2.2. *Cultivo primario de neuronas de corteza motora de rata*

El medio de cultivo para las neuronas de corteza motora consistió en medio Neurobasal suplementado con B-27 (2 %), L-glutamina (2 mM), gentamicina (0,5 mg/l) y penicilina /estreptomicina (100 UI/ml y 100 µg/ml, respectivamente). El B-27 es un suplemento nutricional sin suero, optimizado para mantener la viabilidad neuronal en detrimento de la glía.

El cultivo de neuronas de corteza motora se realizó según el protocolo publicado por M. Yáñez y col., con algunas modificaciones (Figura 23) ^[213]. A partir de ratas preñadas de 18 o 19 días de gestación, se obtuvieron los fetos por cesárea y se decapitaron. Se extrajeron los cerebros, de los que se quitaron las meninges y seguidamente se diseccionó su corteza motora, depositándola en una solución de *buffer* fosfato salino (NaCl 137 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, albúmina de suero bovino o BSA 4 mM, glucosa 1,5 mM, pH = 7,4). Una vez obtenidos los fragmentos de todos los embriones, se sometieron a disgregación mecánica, se contó el número de neuronas ayudados por el colorante vital azul tripano y se resuspendieron en medio Neurobasal. En placas de 48 pocillos previamente tratadas con poli-D-lisina, para facilitar la adhesión de las neuronas a la superficie de los pocillos, se sembraron a una densidad de 30 000 neuronas por pocillo y se dejaron madurar durante 8-10 días, hasta que se observó una red neuronal densa. En ningún momento se les realizó un cambio de medio.

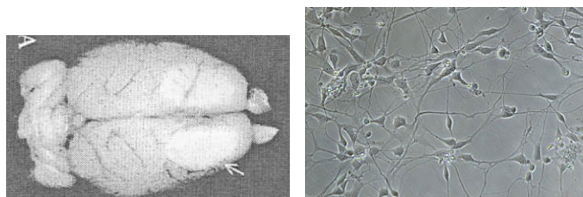


Figura 23. Izquierda, cerebro de ratón con corteza motora resaltada. Derecha, neuronas de corteza motora en el 7º día de cultivo.

2.2.3. *Preparación de rodajas de hipocampo de rata*

Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley de 2 meses de edad y 275-325 g de peso. Todas las soluciones empleadas en este procedimiento se burbujearon previamente con gas carbónico (95 % O₂ y 5 % CO₂) con el fin para mantener la saturación de O₂ y el pH (pH ≈ 7,2) en niveles adecuados. Las ratas fueron decapitadas y los cerebros se extrajeron rápidamente del cráneo, depositándolos en una solución Krebs compuesta de NaCl 120 mM, KCl 2 mM, CaCl₂

0,5 mM, NaHCO_3 26 mM, MgSO_4 10 mM, KH_2PO_4 1,18 mM, glucosa 11mM y sacarosa 200 mM. Los hipocampos se diseccionaron y se cortaron en rodajas de 300 μm de espesor con el equipo McIlwain tissue chopper (EE.UU.), descartándose las rodajas de las porciones más anteriores y más posteriores. Las rodajas se trasladaron a un vial con 3 ml de una solución Krebs (compuesta de NaCl 120 mM, KCl 2 mM, CaCl_2 2 mM, NaHCO_3 26 mM, MgSO_4 1,19 mM, KH_2PO_4 1,18 mM, y glucosa 11 mM), burbujeándose con carbógeno a 34 °C durante 45 min, con el fin de frenar la degradación del tejido. Tras su estabilización, las rodajas se resuspendieron en una mezcla 1:1 de medio DMEM y la solución Krebs anterior, estando las rodajas listas para su utilización en los experimentos de neuroprotección ^[214].

2.2.4. Cultivo primario de células cromafines bovinas

Las glándulas adrenales bovinas se obtuvieron de un matadero de Madrid bajo la supervisión de un veterinario local y se transportaron hasta el laboratorio en una solución Locke (penicilina 50 UI/ml, estreptomicina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, NaCl 154 mM, KCl 5,6 mM, NaHCO_3 3,6 mM, glucosa 5,6 mM, HEPES 5 mM, pH 7,2). Las células cromafines bovinas (ccb) se aislaron según el protocolo estándar de digestión enzimática con collagenasa ^[215], introduciendo algunas modificaciones (Figura 24) ^[216]. Se procede a la limpieza de las glándulas mediante la inyección de solución Locke y la retirada del tejido graso periadrenal. Se realiza una digestión enzimática para la cual, a través de la vena adrenolumbar, se inyecta una solución enzimática (collagenasa 0,25 % y BSA 0,5 %) y se incuba la glándula a 37 °C durante 15 min. De este modo, la collagenasa actúa en condiciones óptimas y libera a las ccb de la red de colágeno en la que están inmersas. Este proceso se realiza hasta 3 veces. A continuación, se secciona la glándula longitudinalmente y se extrae la médula digerida, que se aclara de la collagenasa mediante lavados con la solución Locke. Posibles fragmentos de médula no digeridos se eliminan mediante la filtración de la suspensión obtenida a través de una malla de nailon con un tamaño de poro de 217 μm . El filtrado se centrifuga a 1100 rpm durante 10 min y el precipitado se resuspende en Locke, que vuelve a ser filtrado a través de una malla de nylon con un tamaño de poro de 82 μm . Por último, se centrifugan a 1200 rpm durante 10 min. El precipitado se resuspende en medio DMEM suplementado con SFB (5 %), penicilina (50 UI/ml) y estreptomicina (50 ng/ml). Las células se sembraron en cubreobjetos de vidrio de 1 cm de diámetro (pretratados con poli-D-lisina) a una densidad de 50 000 células por pocillo. Las células se emplearon tras 24-96 h.

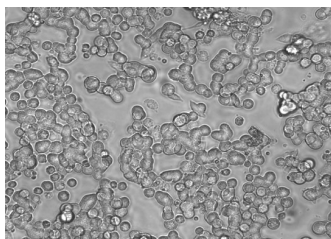


Figura 24. Células cromafines bovinas en cultivo.

2.3. Experimentos de evaluación farmacológica

2.3.1. Experimentos de neuroprotección en células SH-SY5Y

Para evaluar el efecto neuroprotector de los derivados de gramina objeto de esta Memoria, estos se preincubaron con las células SH-SY5Y 24 h después de su siembra, sin haber alcanzado la confluencia. Después de 24 h de preincubación, se procedió a la coincubación de los compuestos con el correspondiente tóxico, cambiando el medio de cultivo por medio fresco con un 1 % de SFB. Una vez finalizadas las 20-24 h de coincubación, se midió la viabilidad neuronal por el método de la reducción del MTT o la actividad fosfatasa por el método del pNPP, que serán explicados en detalle más adelante.

Para los ensayos de neuroprotección con rotenona/oligomicina A (30 μ M/10 μ M, respectivamente), los compuestos se evaluaron a la concentración de 10 nM. Para los experimentos con AO (20 nM para neuroprotección y 15 nM para la actividad fosfatasa), los compuestos se cribaron a 0,1 μ M.

2.3.2. Experimentos de toxicidad per se en células SH-SY5Y

Se siguió el mismo protocolo que en el caso de los ensayos de neuroprotección, manteniendo las células en presencia de los compuestos un total de 48 h, pero sin la adición de ningún tóxico en el momento de la coincubación. Los compuestos se evaluaron a las concentraciones de 3, 10 y 30 μ M.

2.3.3. Medidas de Ca^{2+} citosólico en células SH-SY5Y

Se utilizó la sonda fluorescente de Ca^{2+} FLUO-4/AM (Fluo-4-acetoximetiléster). A las 48 h desde la siembra, cuando las células alcanzaron la confluencia, se eliminó el medio de cultivo y se lavaron las células con una solución Krebs-Hepes (KH, compuesta de: NaCl 144 mM, KCl 5,9 mM, MgCl_2 1,2 mM, CaCl_2 2 mM, D-glucosa 11 mM, HEPES 10 mM, pH 7,4).

Las células se incubaron con la sonda FLUO-4/AM (10 μ M) y ácido plurónico (0,2 %) en KH durante 45 min a 37 °C en la oscuridad. El ácido plurónico es un detergente que facilita la entrada de la sonda en las células. Una vez dentro, el FLUO-4/AM es hidrolizado por esterasas citosólicas a la forma fluorescente activa carboxilato, lo que impide su difusión. Tras ese tiempo, se lavaron dos veces con KH para eliminar el exceso de sonda y se preincubaron con los compuestos a 1 μ M durante 10 min. Una solución de KCl 70 mM se inyectó a las células para estimular la apertura de los CCDV y provocar el incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico. Una vez terminado el experimento, para normalizar las señales de FLUO-4 y registrar la fluorescencia máxima, se añadió tritón X-100 (5 %). El tritón X-100 disuelve las membranas lipídicas, lisando así las células y liberando la sonda al medio, lo que nos permite registrar la fluorescencia máxima en el pocillo. Posteriormente, se añade MnCl_2 (1 M) que desplaza los iones Ca^{2+} de la sonda, anulando su fluorescencia y registrándose así la fluorescencia mínima. La fluorescencia se registró a las longitudes de onda de excitación y emisión de 485 y 520 nm, respectivamente, mediante el lector de fluorescencia en multiplacas FLUOstar Optima (BMG, Alemania) ^[217].

2.3.4. Experimentos de neuroprotección en neuronas de corteza motora

Se preincubaron los compuestos a 0,1 μ M, disueltos en medio Neurobasal y pipeteados directamente en los pocillos, durante 24 h. Posteriormente se añadió la veratridina a los pocillos (concentración final 20 μ M) y se dejó coincubar durante 24 h más. La viabilidad celular se midió por el método de la reducción del MTT, que será explicado más adelante.

2.3.5. Experimentos de toxicidad per se en neuronas de corteza motora

Se siguió el mismo protocolo que en el caso de los ensayos de neuroprotección, manteniendo las células en presencia de los compuestos un total de 48 h, pero sin la adición de ningún tóxico en el momento de la coincubación. Los compuestos se evaluaron a las concentraciones de 1 y 10 μ M.

2.3.6. Experimentos de neuroprotección en rodajas de hipocampo de rata

Los compuestos (10 μ M) y el glutamato (1 mM), disueltos en medio, se coincubaron durante 4 h, manteniendo las rodajas a 37 °C en el incubador. La viabilidad celular se midió por el método de la reducción del MTT.

2.3.7. Método de la reducción del MTT para la medición de la viabilidad celular

Este método, que usa el MTT o bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio como sustrato, se desarrolló en la década de los 80 (Mosmann, 1983; Denizot y Lang, 1986) y permite medir la viabilidad celular de forma rápida, económica y sencilla. Se trata de un ensayo colorimétrico, comúnmente utilizado para el cribado de compuestos, el cual extrapola la viabilidad celular a partir del metabolismo mitocondrial. Las enzimas mitocondriales deshidrogenasas de las células viables, o metabólicamente activas, son capaces de reducir el MTT (coloración amarilla, soluble en medio acuoso) a formazán (coloración morada, insoluble) (Figura 25). Así, se utiliza la función mitocondrial como marcador de viabilidad celular asumiendo que la reducción del MTT será proporcional al número de células viables ^[218].

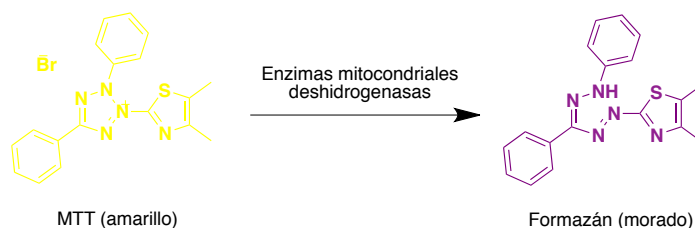


Figura 25. Reducción del MTT a formazán.

Para llevar a cabo el método, el MTT, disuelto en agua (12 mM), se añade directamente a los pocillos (concentración final 1,2 mM) y se incuba durante 2 h en el caso de las células SH-SY5Y o 30 min en el caso de neuronas de corteza motora y de rodajas de hipocampo de rata. Tras retirar el medio, se añade DMSO que lisa las células y solubiliza el formazán resultante. La absorbancia se mide a 540 nm en un lector de placas multipocillo FLUOstar Optima (BMG, Alemania), siendo la señal dependiente de la concentración. A mayor absorbancia, mayor viabilidad celular.

2.3.8. Método del pNPP para la medición de la actividad fosfatasa

El *p*-nitrofenilfosfato (pNPP) actúa como sustrato cromogénico para la mayoría de enzimas fosfatasas. Al desfosforilarlo, generan *p*-nitrofenol, el cual en condiciones alcalinas produce *p*-nitrofenolato, sustancia que absorbe a 405 nm (Figura 26). Es un método inespecífico ya que mide la actividad fosfatasa total de la muestra, pero en presencia de un inhibidor específico de Ser/Thr fosfatasas, como el AO, se acepta que los cambios en la absorbancia se deben a la actividad de estas enzimas ^[219].

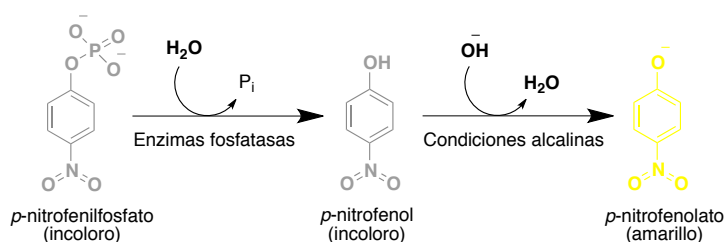


Figura 26. Desfosforilación del pNPP.

Para medir la actividad fosfatasa de las muestras se utilizó el kit *Biosciences Phosphatase Assay* (VWR, España), que proporciona tanto el sustrato de reacción como el *buffer* para la reacción. Se elimina el medio de cultivo de los pocillos y se añade 100 μ l por pocillo de una mezcla 1:1 de sustrato y *buffer* de reacción, siendo la concentración final de pNPP 10 mM. La mezcla de reacción se incubó en oscuridad a 37 °C durante 30 minutos y la absorbancia se midió a 405 nm en un lector de placas FLUOstar Optima, siendo la señal de absorbancia dependiente de la concentración. La mayor absorbancia a esta longitud de onda es indicativa de mayor actividad fosfatasa. Para la medida de la actividad Ser/Thr fosfatasa se añadió al *buffer* $NaVO_3$, 1 mM, que es un inhibidor selectivo de Tyr fosfatasa.

2.3.9. Medidas de corrientes de Ca^{2+} en células cromafines bovinas

Las corrientes de Ca^{2+} (I_{Ca}) generadas por la estimulación de una célula a través de la aplicación de estímulos despolarizantes se midieron mediante la técnica de *patch-clamp* [220], en su modalidad de fijación de voltaje y configuración de célula entera [221].

Los registros se realizaron mediante pipetas pulidas fabricadas a partir de capilares de vidrio de borosilicato PS-830 y MF-830 Narishige (Tokio, Japón), con un diámetro de aproximadamente 1 μ m y una resistencia de 2-5 M Ω . Las células se colocaron en una cámara de metacrilato situada en la plataforma de un microscopio invertido Nikon Diaphot (Japón). Durante el experimento, las células se perfundieron de manera constante con una solución control estándar (NaCl 145 mM, KCl 5,6 mM, $MgCl_2$ 1,2 mM, $CaCl_2$ 2 mM, glucosa 11 mM y HEPES 10 mM, el pH se ajustó a 7,4 con NaOH), con un flujo de 1-2 ml/min. Las células se dializaron internamente con una solución intracelular presente en la pipeta cuya composición es: Cs-glutamato 100 mM, EGTA 14 mM, tetraetilamonio 20 mM, NaCl 10 mM, ATP-Mg 5 mM, GTP-Na 0,3 mM, HEPES 20 mM, el pH se ajustó a 7,3 con CsOH.

Para la estimulación celular y la adquisición de datos se empleó el programa PULSE v8.74 (HEKA Elektronik). Los análisis se realizaron con el mismo programa. Los registros se adquirieron con una frecuencia de muestreo de 20 kHz. Los registros con una corriente de fuga

superior a 30 pA se descartaron, así como aquellas células en las que la resistencia de acceso transitorio capacitativo alcanzaba valores $> 30 \text{ M}\Omega$.

Las soluciones extracelulares que superfunden a las células se intercambiaron mediante un sistema de válvulas excluyentes controladas electrónicamente que están acopladas a una pipeta de perfusión cuya punta se posicionaba a menos de $100 \mu\text{m}$ de la célula en experimentación, con un flujo de aproximadamente 1 ml/min regulado por gravedad. El nifedipino, la ω -conotoxina MVIIC y los compuestos se perfundieron de esta manera.

Para la medida de las I_{Ca} , el potencial de membrana de las células se fijó a -80 mV . A continuación, se aplicó una curva I-V, para la cual se dieron pulsos despolarizantes de 50 ms de duración desde -60 mV a $+60 \text{ mV}$ cada 10 seg . Tras este protocolo, se aplicaron pulsos despolarizantes de 50 ms de duración cada 20 seg , al voltaje donde se había obtenido la máxima corriente en la I-V. Así, después de aplicar varios pulsos control, se perfundieron los compuestos hasta que el bloqueo se mantuvo constante. Por último, se lavaron los compuestos. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente ($24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) en células de 1-4 días tras el cultivo.

Estos experimentos se realizaron en el laboratorio del Prof. Luis Gandía en el departamento de Farmacología y Terapéutica de la Universidad Autónoma de Madrid.

2.3.10. Determinación de la expresión de fosfotau mediante western blot

El *western blot* o *immunoblot* es una técnica analítica que nos permite cuantificar la expresión de proteínas en muestras biológicas. Para ello, se separan las proteínas de la muestra por electroforesis en función de su peso molecular y, posteriormente, mediante el empleo de anticuerpos específicos estas proteínas son detectadas.

Para llevar a cabo el *immunoblot*, las células SH-SY5Y se sembraron en placas de 48 pocillos a una densidad de $70\,000$ células por pocillo. Al día siguiente, se preincubaron los compuestos a $0,1 \mu\text{M}$ durante 24 h , seguidas de otras 20 h de incubación de los compuestos junto con AO 20 nM . Se levantaron cuidadosamente las células de los pocillos con la ayuda de una punta de pipeta, se lavaron con PBS dos veces para eliminar los restos del medio de cultivo y se centrifugaron a 800 rpm durante 10 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, manteniendo las muestras siempre en hielo. Los precipitados se guardaron a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su utilización.

Las proteínas citosólicas, como la proteína tau, se extrajeron mediante el *M-PER[®] Mammalian Protein Extraction Reagent* (Thermo Scientific, EE.UU.), resuspendiendo los precipitados suavemente con el *vortex* y manteniéndolos en agitación a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 min . En todo momento, las proteínas se mantuvieron en presencia de inhibidores de proteasas *Halt Protease Inhibitor Cocktail* (Thermo Scientific, EE.UU.) e inhibidores de fosfatasas (NaVO_3 , 1 mM).

Tras una centrifugación a 12 000 rpm durante 15 min a 4 °C, se recogieron las proteínas citosólicas contenidas en el sobrenadante. Dada la baja cantidad de muestras recogida, la cantidad de proteína no fue cuantificable. Se normalizaron los resultados en función de las bandas de β -actina, nuestro control de carga.

A continuación, se desnaturalizaron las proteínas en tampón Laemli 5X durante 5 min a 100 °C. Las proteínas se cargaron y se sometieron a una electroforesis de amperaje constante (SDS-PAGE, 12 %) y se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno Immobilon-P Transfer Membrane (Millipore, EE.UU.). Las membranas se bloquearon durante 2 h en solución tampón Tris-salino con 0,05 % Tween-20 y 4 % de BSA y a continuación se incubaron otras 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo primario anti-*p*tau (AT8, *p*Ser202/*p*Thr205, 1:1000), suministrado por Thermo Life Technologies (Oregon, USA). Para la detección de la proteína control de carga se utilizó anti- β -actina (1:100 000; Sigma-Aldrich, EE.UU.). Tras lavar las membranas varias veces con la solución Tris-Tween 20 (1 %), se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (1:10 000; Santa Cruz Biotechnology, Alemania) durante 45 min a temperatura ambiente. Finalmente, las membranas se revelaron por quimioluminiscencia con ECL Select Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Barcelona, España). La densitometría óptima de las bandas obtenidas se cuantificó mediante el programa Scion Image Alpha 4.0.3.2. (Maryland, EE.UU.).

2.4. *Análisis estadístico y representación de datos farmacológicos*

Los valores de los resultados farmacológicos se expresan como la media \pm error estándar, habiéndose utilizado siempre al menos cuatro experimentos independientes para cada valor. Las comparaciones entre los grupos experimentales y el control se realizaron mediante un análisis estadístico de la varianza (ANOVA) seguido de un test post hoc Dunnett, en el caso de las medidas de Ca^{2+} citosólico, o Newman-Keuls, en el resto de experimentos. Las diferencias entre los grupos se consideraron estadísticamente significativas cuando $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) y $p \leq 0,001$ (***). Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism 5.0. (California, EE.UU.).

En los experimentos de neuroprotección, el % *Viabilidad* celular se calcula tomando como 100 % el promedio de las absorbancias obtenidas en las células sin tratamiento, aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{Absorbancia media células tratadas}}{\text{Absorbancia media células control}} \times 100$$

De manera análoga, el % *Actividad fosfatasa* se calcula tomando como 100 % el promedio de las absorbancias obtenidas en las células sin tratamiento, aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Actividad fosfatasa} = \frac{\text{Absorbancia media células tratadas}}{\text{Absorbancia media células control}} \times 100$$

El % *Protección* se calcula tomando como 100 % el promedio de la muerte celular obtenida en los pocillos tratados únicamente con el tóxico, aplicando la fórmula:

$$\% \text{ Protección} = 100 - \left(\frac{\% \text{ muerte células con tóxico y compuesto}}{\% \text{ muerte células sólo tóxico}} \times 100 \right)$$

En las medidas de Ca^{2+} citosólico con la sonda FLUO-4, el % *Bloqueo* se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Bloqueo} = 100 - \Delta[\text{Ca}^{2+}]_c$$

Donde el $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_c$ se calcula comparando la entrada de Ca^{2+} en los pocillos sin compuestos en relación a los pocillos con compuestos y se expresa como % en relación a $F_{\max} - F_{\min}$, aplicando la siguiente fórmula:

$$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_c = (\text{Absorbancia compuestos} - \text{Absorbancia basal}) / (F_{\max} - F_{\min})$$

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. BÚSQUEDA DE UN NUEVO COMPUESTO ACTIVO O HIT: GRAMINA

1.1. Introducción

La mayoría de los fármacos que actualmente se encuentran en el mercado son derivados sintéticos de productos de origen natural ^[222]. La naturaleza es un prolífico reservorio para el descubrimiento de nuevos fármacos gracias a la diversidad y la complejidad de sus estructuras, así como por el hecho de que la mayoría de los compuestos naturales son ligandos multidiana ^[222]. Sin embargo, estos productos naturales presentan limitaciones como, por ejemplo, una baja biodisponibilidad, una baja potencia o unos mecanismos de acción demasiado complejos. Por este motivo, se requiere de la química médica para su optimización y transformación en fármacos, con propiedades farmacológicas y farmacocinéticas aptas para su utilización en la terapéutica. Centrándonos en la EA, muchos autores defienden que las sustancias de origen natural, más que las sintéticas, han demostrado ser un excelente punto de partida para el descubrimiento y el desarrollo de nuevos fármacos ^[223] ^[224] ^[225]. Como prueba de ello está que dos de los cuatro compuestos disponibles para la EA son de origen natural, la galantamina y la rivastigmina. La galantamina es un alcaloide aislado de los bulbos de *Galanthus woronowii* y de diferentes especies de la familia *Amaryllidaceae* ^[226]. La rivastigmina es un análogo sintético del alcaloide anticolinesterásico fisostigmina, que procede de las semillas de *Physostigma venosum* ^[227].

Otros productos naturales de origen vegetal con numerosas propiedades farmacológicas interesantes son los polifenoles como, por ejemplo, la curcumina, presente en los extractos de *Curcuma longa*. Este compuesto, además de ser un potente antioxidante, aumenta la producción de la citoquina antiinflamatoria IL-4 y reduce los niveles de β A y tau en un modelo de ratón transgénico que sobreexpresa β A ^[228]. Además, como se ha mencionado anteriormente, es capaz de mitigar la disminución de la expresión de la subunidad B de PP2A en modelos de isquemia cerebral ^[229]. La tansinona IIA, procedente de *Salvia miltiorrhiza*, es un terpenoide que posee un efecto protector frente a la neurotoxicidad y la hiperfosforilación de tau inducida por β A ^[230]. Otro ejemplo es el compuesto EHT, mencionado anteriormente (Figura 11), aislado a partir de extractos de diferentes plantas del género *Coffea* y capaz de activar PP2A a través de la inhibición de su desmetilación ^[107].

En el curso de la búsqueda de nuevos compuestos activos que sirvan para el desarrollo de fármacos con actividad neuroprotectora y originales propiedades farmacológicas descubrimos

que el alcaloide natural gramina (**1**) (Figura 27), y algunos de sus derivados, han sido objeto de interesantes estudios, atribuyéndoseles propiedades biológicas y terapéuticas.

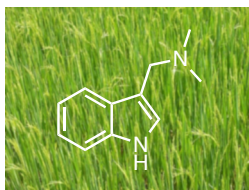


Figura 27. Estructura de la gramina (**1**).

La gramina (**1**) es un alcaloide indólico de origen vegetal que fue aislado por primera vez por Orenkov y Norkina en 1935. Lo extrajeron de la caña común *Arundo Donax*, que filogenéticamente pertenece a las plantas herbáceas de la familia *Poaceae* o gramíneas, siendo denominada en un primer momento donaxina ^[231]. Por su estructura indólica ha sido ampliamente estudiado y utilizado como precursor en química orgánica y médica, para la síntesis de derivados de triptófano, ácido nicotínico, serotonina, etc ^[232]. Sin embargo, también ha sido objeto de interesantes estudios biológicos, tanto por sí misma como algunos de sus derivados, atribuyéndoseles actividades farmacológicas interesantes. Entre ellas, se ha descrito que la gramina (**1**) (Figura 28) posee la capacidad de regular el metabolismo energético de la mitocondria, ya que a bajas concentraciones (< 0,35 mM) estimula la cadena respiratoria mitocondrial, mientras que a altas concentraciones (> 1 mM) inhibe el complejo I. El complejo II de la cadena transportadora de electrones es insensible a la gramina (**1**) ^[233].

Dada su similitud estructural, son muchos los estudios que abordan el papel de la gramina y sus derivados sobre receptores de serotonina. Settimo y col. ^[234], sintetizaron una serie de derivados bromados y metilados (compuestos 2 y 3, Figura 28) que presentaron significativas propiedades antiserotoninérgicas. Otros derivados similares también confirmaron esta actividad (compuesto 4, Figura 28) ^[235], así como derivados *N*-bencilados (compuesto 5, Figura 28) ^[236]. Más recientemente, Frolid y col. han demostrado el efecto vasorrelajante de la gramina (**1**) sobre el músculo liso de arteria de rata, previamente contraído con serotonina, por inhibición directa de los receptores 5-HT_{2A} ^[237]. Por último, derivados más complejos del tipo *N*-bencenosulfonilgraminas (compuesto 6, Figura 28) parecen ejercer un antagonismo 5-HT₆, con potencial indicación como antipsicóticos o antidepresivos ^[238].

El compuesto 3 (Figura 28) también mostró efectos analgésicos y antiinflamatorios, ya que inhibe la síntesis de prostaglandinas, con potencia similar a indometacina ^[239]. Otro derivado, el (3-[3-(dimetilaminometil)-1*H*-indol-7-il]propan-1-ol) (compuesto 7, Figura 28), inhibe a la fosfolipasa A2, reduciendo así la inflamación ^[240]. Por otro lado, algunos derivados sencillos

(compuestos 8 y 9, Figura 28) presentan actividad antioxidante en varios modelos *in vitro* de estrés oxidativo ^[241]. Derivados polibromados de origen marino (compuestos 10 y 11, Figura 28) han demostrado capacidad moduladora de la $[Ca^{2+}]_c$ mediante dos vías: bloqueo de los CCDV tipo L en músculo liso de aorta ^[242] e inducción de la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático por estimulación de los receptores de rianodina, de manera concentración-dependiente ($EC_{50} = 22,2 \mu M$), presentando mayor potencia que la cafeína ^[243].

No obstante, centrándonos en otras dianas estudiantas en la EA, la gramina no es capaz de inhibir la enzima acetilcolinesterasa ^[244], ni es antagonista del receptor NMDA ^[245]. Por otra parte, aunque no presenta actividad antineoplásica ^[198], derivados más complejos sí que son capaces de producir un efecto antitumoral ^[198] ^[246].

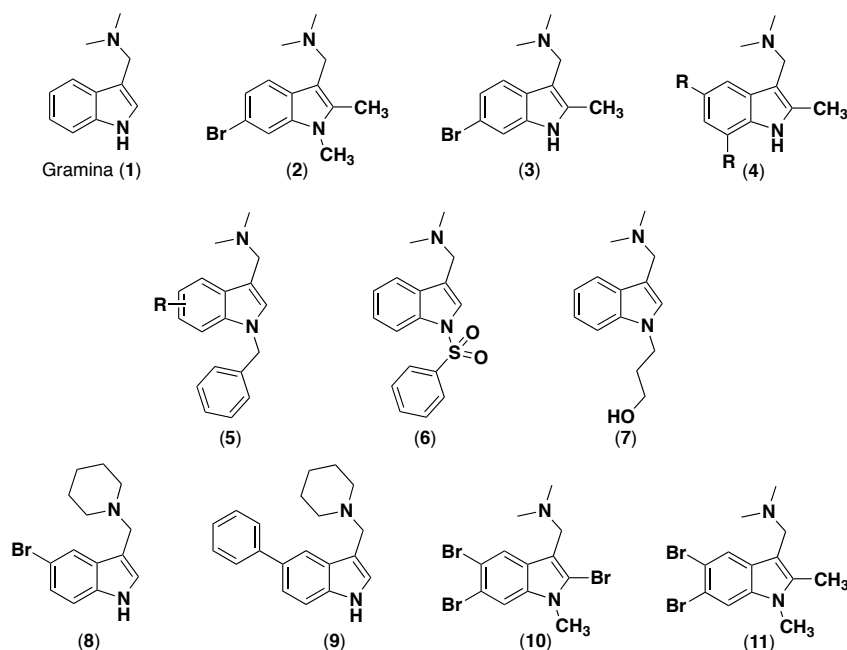


Figura 28. Estructuras de la gramina (1) y sus derivados (2-11) con actividad farmacológica de interés.

1.2. Evaluación del perfil neuroprotector de la gramina en modelos *in vitro* relacionados con neurodegeneración

Teniendo en cuenta que la gramina posee una interesante estructura indólica, presente en muchas aminas biogénicas como la serotonina o la melatonina, y que algunos de sus derivados son capaces de bloquear los CCDV, decidimos evaluar su toxicidad neuronal y su actividad en dos modelos *in vitro* relacionados con neurodegeneración, para confirmar su potencial indicación en enfermedades neurodegenerativas.

Toxicidad per se de la gramina

Puesto que la familia de compuestos objeto de esta Memoria de Tesis tienen como finalidad actuar sobre el sistema nervioso central, en primer lugar se evaluó la toxicidad de la gramina en dos modelos neuronales *in vitro*: la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y y las neuronas corticales de cultivo primario de embriones de rata (Figura 29).

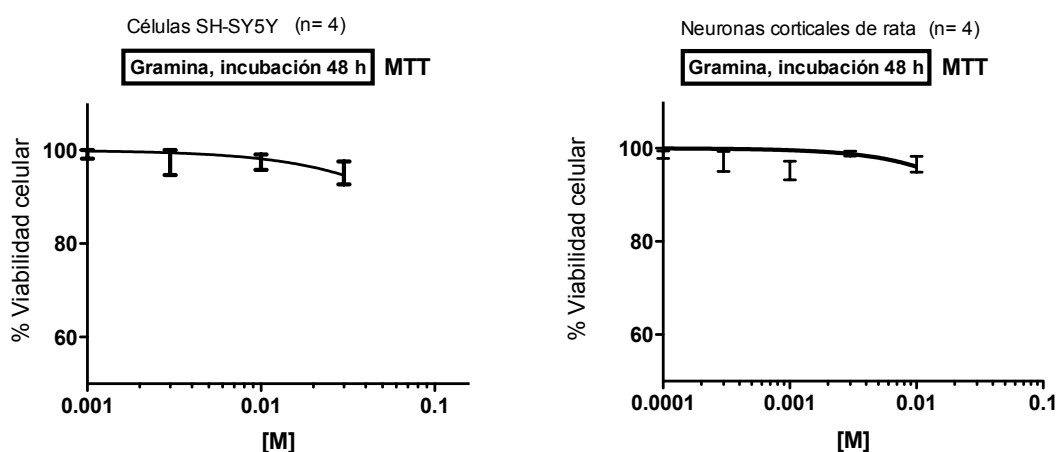


Figura 29. Toxicidad per se de la gramina en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y y neuronas de corteza motora de embriones de rata. Tras 48 h de incubación de las células con la gramina a diferentes concentraciones, se midió la viabilidad celular por el método de la reducción del MTT. No se encontraron diferencias significativas a ninguna de las concentraciones evaluadas.

La gramina no causó toxicidad neuronal en ninguno de los dos modelos celulares empleados, alcanzando concentraciones de hasta 30 μ M en el caso de las células SHSY5Y y 10 μ M en neuronas corticales.

Modelo de hiperfosforilación de tau inducido por ácido okadaico en células SH-SY5Y

Como se ha mencionado en la *Introducción*, el AO es una buena herramienta farmacológica para remedar la neurodegeneración observada en la EA gracias a su potente inhibición de las fosfatasa PP1 y PP2A, la cual conduce a la hiperfosforilación de la proteína tau, y por consiguiente la acumulación de β A, la muerte neuronal, la pérdida de sinapsis y los déficits cognitivos, tanto en modelos *in vitro* como en *in vivo* ^{[92] [247]}. El AO (Figura 30) es una compleja toxina tipo poliéter procedente de las especies de dinoflagelados marinos *Prorocentrum sp.* y *Dinophysis sp.* Se trata de un potente pero poco selectivo inhibidor de PPP, presentando unas CI_{50} de 15 nM para PP1, de 0,1 nM para PP2A y PP4, y de 3,5 nM para PP5 (calcineurina y PP7 son insensibles) ^[248]. En general, los efectos celulares causados por AO se

atribuyen a la inhibición de PP2A ^[61], dado que la inhibe con una potencia 150 veces mayor que a PP1 y la contribución de otras PPP a la actividad fosfatasa total es pequeña. Aun así, no se puede despreciar su actividad sobre PP1 u otras Ser/Thr fosfatasas, y es por esto que en esta Memoria de Tesis se hablará de actividad Ser/Thr fosfatasa total. El mecanismo por el cual el AO inhibe a PP2A es mediante la interacción directa con su subunidad C, como será explicado en detalle en el próximo apartado, así como mediante el incremento de la fosforilación de Tyr 307 y la inhibición de la metilación de Leu 309 ^[76]. En relación a otros inhibidores de PP2A, la fostriecina es el inhibidor de PP2A más selectivo disponible, pero su inestabilidad química limita su utilización y por este motivo el AO sigue siendo el inhibidor más utilizado ^[69].

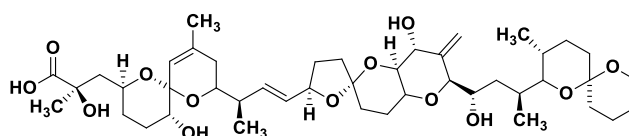


Figura 30. Estructura química del ácido okadaico.

Numerosos autores han corroborado que este modelo de neurodegeneración se puede reproducir mediante el tratamiento de células SH-SY5Y con AO, a concentraciones nanomolares y durante 4-48 h ^[249] ^[250]. Así, se evaluó la gramina, en un amplio rango de concentraciones (0,001-30 μ M), ajustando la concentración y el tiempo de exposición del AO a 20 nM y 20 h, respectivamente, lo cual induce una mortalidad celular entorno al 40 %. Como control positivo, se utilizó la melatonina a 30 nM, la cual presenta propiedades neuroprotectoras en este modelo, tanto por su actividad antioxidante como su habilidad para mantener la actividad de PP2A ^[251] ^[109, 252]. La gramina mostró, a todas las concentraciones evaluadas, valores de neuroprotección mayores del 80 %, incluso del 95 % a la concentración de 1 μ M (Figura 31).

En relación a su ventana terapéutica o intervalo de concentración entre el efecto tóxico de la gramina y su efecto terapéutico, podemos afirmar que es amplia. Basándonos en los resultados de la toxicidad *per se*, la gramina no es tóxica en concentraciones menores de 30 μ M. A su vez, presenta propiedades neuroprotectoras en el modelo de hiperfosforilación de tau desde concentraciones de 1 nM. Por tanto, estamos ante un compuesto con potencial indicación para enfermedades neurodegenerativas con un amplio margen de seguridad.

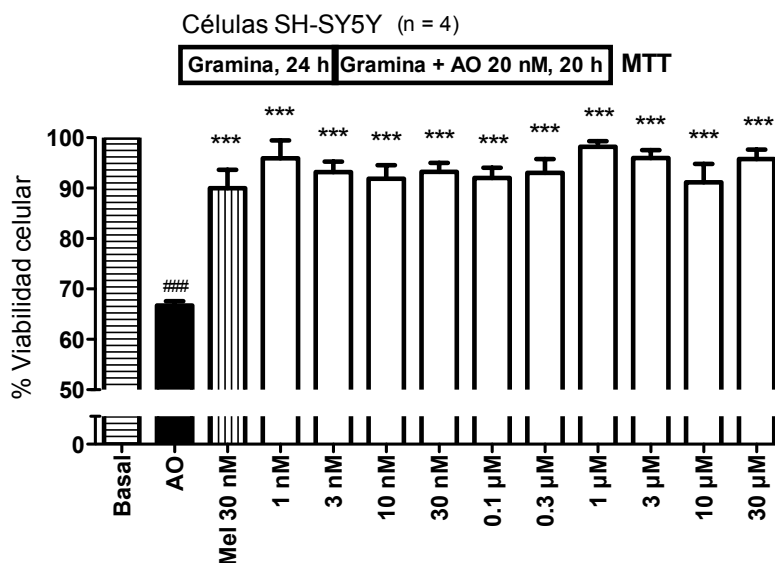


Figura 31. Efecto neuroprotector de la gramina frente al ácido okadaico. Tras 24 h de incubación con la gramina, las células SH-SY5Y se expusieron al AO 20 nM y a la gramina, a diferentes concentraciones, durante 20 h. La viabilidad celular se midió por el método de la reducción del MTT. Los datos se expresan como la media \pm error estándar de al menos 4 experimentos, normalizados frente a la viabilidad celular en ausencia de los compuestos. ### $p < 0,001$, respecto a células no tratadas, *** $p < 0,001$, respecto a la viabilidad de células tratadas con AO en ausencia de gramina. No existen diferencias significativas entre los pocillos sin tratamiento y los pocillos con AO más gramina en las concentraciones de 1 nM y 1 μ M.

Modelo de estrés oxidativo inducido por rotenona/oligomicina A en células SH-SY5Y

Como se ha mencionado en la *Introducción*, el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial juegan un importante papel en la etiopatogenia de la EA, así como de otras enfermedades neurodegenerativas. La exposición de las células SH-SY5Y, durante 24 h, al cóctel tóxico formado por rotenona y oligomicina A (R/O, 30 y 10 μ M, respectivamente) constituye un buen modelo de estrés oxidativo originado en la mitocondria [253]. La mezcla de R/O bloquea los complejos I y V, respectivamente, de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, causando la generación de ROS y el bloqueo de la síntesis de ATP. En este modelo, la melatonina a 30 nM, es un buen control positivo gracias a sus propiedades antioxidantes [253]. Tal y como se observa en la Figura 32, la gramina presenta propiedades antioxidantes capaces de paliar la pérdida de viabilidad celular producida por R/O a las concentraciones comprendidas entre 10 nM y 0,3 μ M, ofreciendo un 40 % de protección máxima.

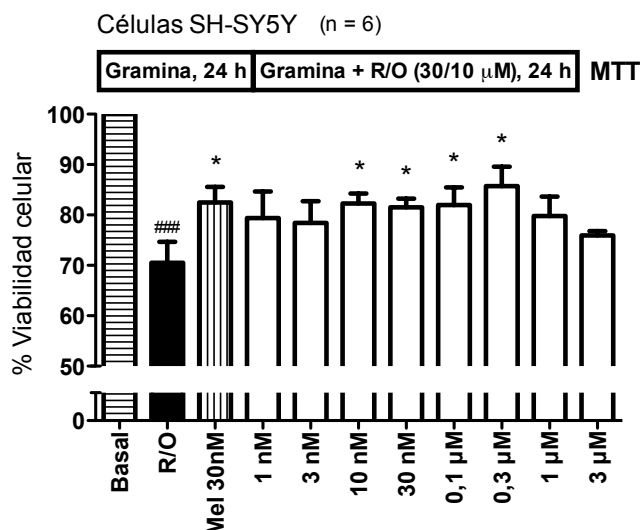


Figura 32. Efecto neuroprotector de la gramina frente a la rotenona y la oligomicina A. Tras 24 h de incubación con la gramina, las células SH-SY5Y se expusieron al cóctel R/O, 10 y 30 μ M respectivamente, y a la gramina, a diferentes concentraciones, durante 24 h. La viabilidad celular se midió por el método de la reducción del MTT. Los datos se expresan como la media \pm error estándar de al menos 6 experimentos, normalizados frente a la viabilidad celular en ausencia de los compuestos. ### $p < 0,001$, respecto a células no tratadas, * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$, respecto a las células tratadas con R/O en ausencia de gramina.

1.3. Estudios de anclaje molecular o docking de gramina y PP2A

En el apartado anterior se muestra que la gramina tiene el potencial para ser un compuesto dirigido al tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Como se ha mencionado previamente, que la gramina posee el potencial de modular los CCDV fue demostrado por Iwata y col., quienes estudiaron el bloqueo de CCDV del subtipo L por derivados de gramina polibromados ^[242]. Por otro lado, sus excelentes resultados de neuroprotección en el modelo de hiperfosforilación de la proteína tau ponen de manifiesto su potencial actividad sobre las Ser/Thr fosfatasa. Por este motivo, se decidió confirmar la interacción entre PP2Ac y gramina mediante técnicas de anclaje o *docking* molecular.

En la base de datos *Protein Data Bank* (PDB; www.rcsb.org) se puede encontrar la estructura de PP2A cristalizada con algunas de sus subunidades B reguladoras, con enzimas moduladoras de su función, como PTPA o LCMT-1, o con inhibidores exógenos, como la dinofisistoxina-1 o el AO. Se eligió para esta Memoria de Tesis la catalogada como 2IE4 (Figura 33), que presenta las subunidades C (36 kDa) y A (65 kDa) de PP2A, isoforma α en ambos casos y procedentes de *Homo sapiens*, co-cristalizadas con el inhibidor AO y dos átomos de Mn^{2+} en el sitio catalítico.

Las isoformas α son las de mayor prevalencia y por tanto las de mayor interés para nuestro estudio de anclaje molecular. Aunque las dos isoformas de la subunidad C comparten un 97 % de homología, la isoforma α es 10 veces más abundante. Lo mismo ocurre con la subunidad A, sus dos isoformas comparten un 87 % de homología pero aproximadamente el 90 % de la holoenzimas de PP2A contienen la isoforma α ^[254]. La resolución del cristal nos indica una precisión de la nube electrostática que rodea los átomos de la estructura de 2,6 Å, adecuada para nuestros estudios.



Figura 33. Estructura 2IE4 con la holoenzima de PP2A unida a ácido okadaico. Tomadas de la base de datos *Protein Data Bank* (www.rcsb.org).

Puesto que se desconoce el sitio de unión de los inhibidores endógenos a PP2Ac y que todas las toxinas dirigidas a PP2A se unen en el mismo lugar (Figura 34) ^[71], para esta Memoria de Tesis se realizó un *docking* dirigido a la cavidad en la que se sitúa el AO. En la Figura 34, se puede observar cómo el AO se posiciona lejos de las repeticiones HEAT donde se unen las subunidades C y A, pero sí que está dentro del sitio catalítico de la subunidad C, muy próximo a los dos átomos de Mn^{2+} . Si se analiza en detalle (Figuras 34 y 35), la Arg 89 y la Tyr 265 donan hidrógenos para crear enlaces de hidrógeno con diferentes oxígenos presentes en el AO. La leu 243, Tyr 265, Cys 266, Arg 268 y Cys 269 realizan numerosas interacciones de tipo Van der Waals con el AO. En el otro extremo del bolsillo de unión, cuatro aminoácidos de la PP2Ac (Gln 122, Ile 123, His 191 y Trp 200) forman una cavidad hidrófoba, capaz de acomodar el extremo hidrófobo del AO. En dicha cavidad radica la diferente selectividad del AO por PP1 y PP2A, ya que PP1 carece de ella, y por ello el AO no es capaz de interactuar con PP1 con tanta afinidad como lo hace con PP2A.

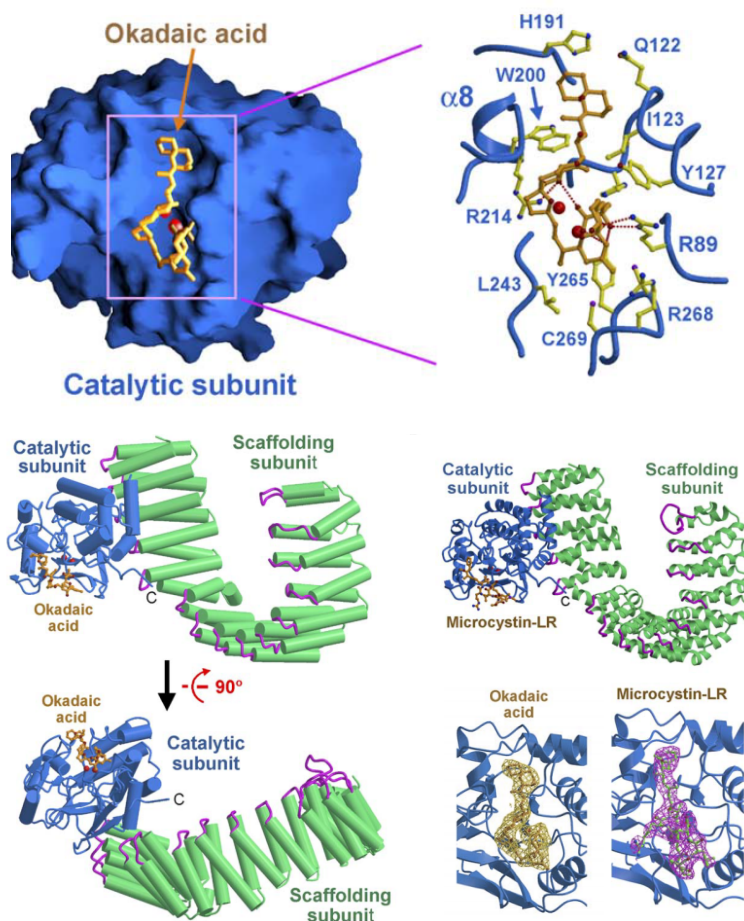


Figura 34. Arriba, unión del ácido okadaico a PP2Ac y aminoácidos con los que existen interacciones. Abajo, unión de las toxinas ácido okadaico y microcistina-LR a PP2A. Modificadas de Xing y col., 2006.

En la Figura 35 se puede apreciar cómo el AO, en condiciones fisiológicas, se pliega sobre sí mismo mediante enlaces de hidrógeno intramoleculares, siendo el extremo del ácido carboxílico el responsable de la inhibición de la actividad fosfatasa de PP2A mediante el bloqueo del acceso de los sustratos al sitio catalítico ^[255]. Sin embargo, el extremo C28-C38 del AO únicamente proporciona selectividad sobre PP2A, y por sí mismo no es capaz de inhibir la actividad fosfatasa ^[256]. Es precisamente este fragmento del AO el que muestra interacciones con la cavidad hidrófoba presente en PP2Ac, lo que nos lleva a pensar que compuestos dirigidos a ese pequeño bolsillo hidrófobo serán capaces de impedir la unión de inhibidores exógenos, y presumiblemente endógenos, y mantener así la actividad fosfatasa. En resumen, para que un compuesto sea capaz de inhibir la interacción de inhibidores endógenos sin afectar a su función fosfatasa, se debe evitar el acercamiento a los residuos Tyr 265, Arg 89, Tyr 127, Cys 269, Leu 243, Arg 268 y Arg 214. Sin embargo, interacciones con los residuos que forman la cavidad hidrófoba, es decir, Trp 200, His 191, Gln 122 e Ile 123 indicarían que el compuesto se encuentra en el bolsillo deseado.

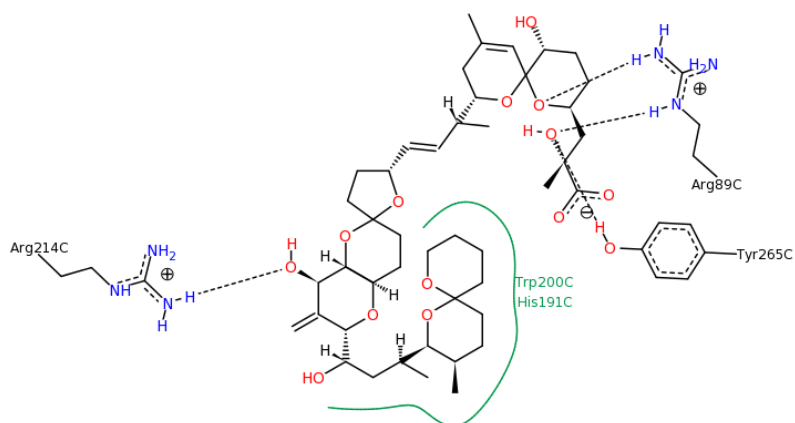


Figura 35. Interacciones entre PP2Ac y el ácido okadaico más significativas.

Dicha estrategia ha sido previamente corroborada en nuestro grupo de investigación, con el caso del compuesto ITH 12246. Esta molécula multidiana mostró un amplio perfil neuroprotector y se dilucidó, mediante técnicas de inmunoprecipitación y medición de la actividad enzimática por el método de verde malaquita, que uno de sus mecanismos de acción era el mantenimiento de la actividad fosfatasa de PP2A^[257]. Al profundizar en el estudio de su interacción con PP2A, se observó que el compuesto podía considerarse un análogo estructural de un fragmento del AO, interaccionando con los mismos aminoácidos que el AO en PP2Ac. Se propuso la hipótesis de que el mecanismo de acción del compuesto ITH 12246 consistía en la inhibición de la unión del AO a PP2A, pero sin afectar al sitio catalítico, de manera que la enzima podía mantener su actividad Ser/Thr fosfatasa^[257]. En experimentos *in vivo* en ratones, el compuesto ITH 12246 fue capaz de paliar la pérdida de memoria evocada por escopolamina, así como reducir el volumen de infarto tras una fototrombosis^[258].

Al realizar el *docking* dirigido de la gramina al bolsillo de PP2Ac en el que el AO se une, se aprecia cómo la gramina se une precisamente en la cavidad hidrófoba deseada (Figura 36, arriba), quedando alejada del sitio catalítico y no interaccionando con ninguno de los aminoácidos que lo forman. Por el contrario, sí que presenta interacciones con los residuos que conforman la cavidad hidrófoba (Figura 36, abajo):

- Interacción hidrofóbica plana π - π entre los anillos aromáticos de la gramina y el Trp 200, a una distancia de enlace de 3,82 Å.
- Interacción iónica de transferencia de carga con entre el anillo bencénico de la gramina y el aminoácido de carga positiva His 191, a una distancia de 4,51 Å.
- Interacción de enlace de hidrógeno entre el carbonilo de la Pro 190 y el NH indólico de la gramina, a una distancia de enlace de 2,38 Å.

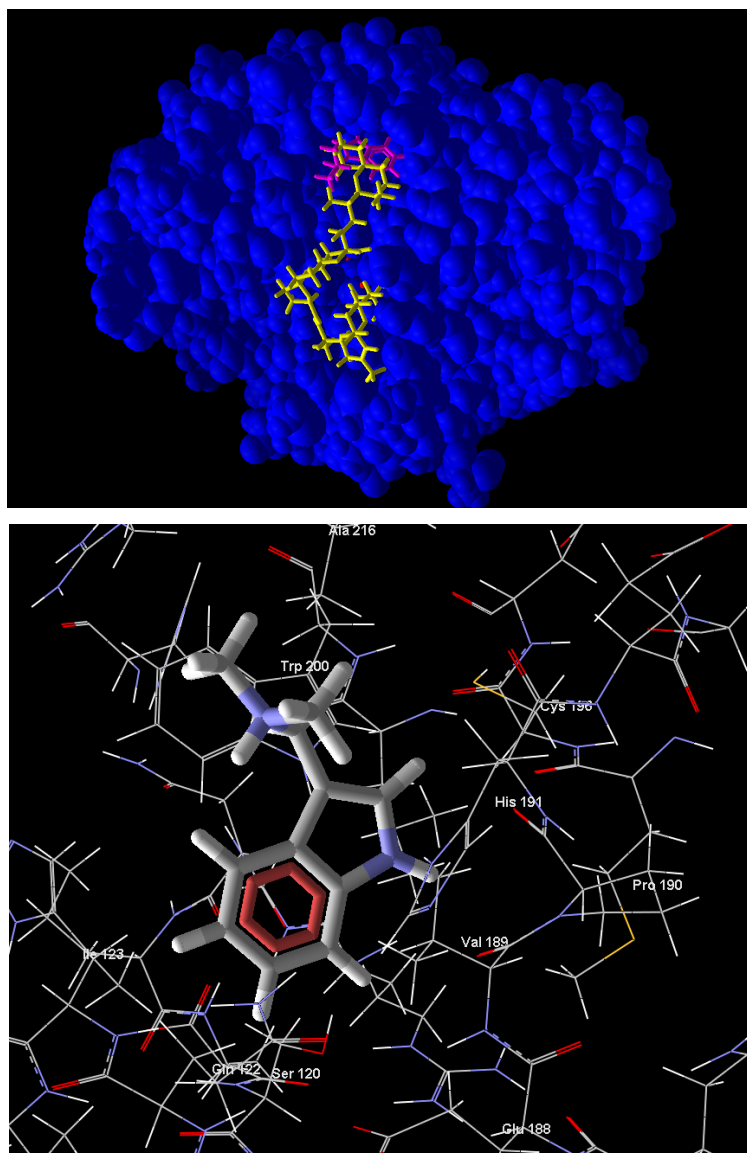


Figura 36. Arriba, anclaje molecular del ácido okadaico (en amarillo) y gramina (en morado) en PP2Ac (en azul). Abajo, ampliación de los aminoácidos con los que la gramina puede interaccionar, en un radio de 8 Å.

Por tanto, la gramina aparentemente es capaz de unirse a PP2A en la cavidad hidrófoba presente en su subunidad C, sin afectar al sitio catalítico.

Por otro lado, como se ha mencionado en la *Introducción*, policationes como la polilisina y la protamina, así como compuestos muy básicos, en concreto las histonas, fueron los primeros compuestos descritos capaces de activar PP2A *in vitro* ^[100]. Este hecho, junto con que otros moduladores de PP2A descritos recientemente también se encuentren cargados positivamente a pH fisiológico, como por ejemplo la memantina, ha dado lugar a la clasificación de los compuestos catiónicos y básicos como una nueva familia de compuestos activadores de PP2A ^{[99] [259]}. En el caso de la gramina, la dimetilamina que presenta en C3 se encuentra cargada

positivamente a pH fisiológico, por lo que cumpliría los requisitos para pertenecer a dicha familia de activadores de PP2A.

1.4. Conclusiones parciales

- La gramina ofrece un gran potencial como compuesto de partida, por sus propiedades farmacológicas descritas, en especial su actividad sobre los CCDV, y la riqueza sintética que ofrece, siendo susceptible de sufrir diversas modificaciones estructurales.
- Carece de toxicidad en modelos *in vitro* neuronales en las concentraciones evaluadas y muestra un buen perfil neuroprotector en los modelos de hiperfosforilación de la proteína tau y de estrés oxidativo.
- Estudios *in silico* predicen su potencial actividad moduladora de PP2A, basándonos en estudios de anclaje molecular y en su estructura de amina catiónica.
- Por tanto, la gramina es un buen punto de partida o compuesto *hit* para el diseño de derivados con actividad dual sobre los CCDV y las Ser/Thr fosfatasas.

2. **DISEÑO DE NUEVOS DERIVADOS DE GRAMINA**

2.1. ***Introducción***

Las etapas de diseño y optimización son dos procesos claves en el desarrollo de un fármaco. Conociendo las dianas terapéuticas sobre las que se quiere actuar, dichas etapas se pueden abordar mediante dos estrategias diferentes y complementarias, en base a la estructura de ligandos conocidos (métodos indirectos) o bien conociendo la estructura tridimensional de la diana y aplicando técnicas computacionales (métodos directos). Para el diseño de los derivados de gramina se aplicaron ambas estrategias. Además, desde un punto de vista químico, se eligieron los sustituyentes que proporcionaban al sistema variabilidad estructural y con accesibilidad sintética, es decir, que los derivados diseñados fueran viables experimentalmente, bien a partir de derivados comerciales o accesibles sintéticamente a partir de precursores.

Se seleccionaron las siguientes posiciones de la estructura de gramina para la introducción de los sustituyentes (Figura 37):

- Sustitución en el nitrógeno indólico (R_1): posición fácilmente modificable mediante reacción de sustitución nucleófila bimolecular sobre haluros de alquilo, capaz de admitir una gran variedad de sustituyentes.
- Sustitución en la amina terciaria (R_2): como será explicado posteriormente, existen numerosos compuestos con estructura de (1*H*-indol-3-il)etanamina descritos en la literatura, los cuales presentan dos carbonos entre el anillo indólico y la amina terciaria. Por el contrario, muy pocos compuestos presentan una estructura de (1*H*-indol-3-yl)metanamina, donde solo hay un carbono conector, debido presumiblemente a la alta inestabilidad de esta estructura, que fácilmente puede sufrir una reacción de retro-Mannich dando lugar al 3-metileno-3*H*-indol ^[232] ^[260]. A pesar de ello, para el diseño de los derivados objeto de esta Memoria de Tesis, resulta imprescindible mantener la estructura de metanamina, puesto que es el único sustituyente presente en la gramina y, por tanto, una característica fundamental que se pretende preservar en todos sus derivados. La posible modificación de esta parte de la molécula radica en los sustituyentes de la amina terciaria (R_2).
- Sustitución en el anillo bencénico fusionado (R_3): el benceno permite tanto la introducción de distintos sustituyentes como el intercambio por otro anillo aromático. Dentro del benceno, se eligió el carbono C5 como posición a modificar, por analogía con las aminas biogénicas de tipo indólico, la melatonina y la serotonina, ambas con sustituciones en dicho carbono.

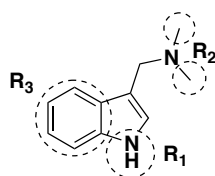


Figura 37. Posiciones seleccionadas en la molécula de gramina para la introducción de sustituyentes.

2.2. Diseño de nuevos derivados en base a la estructura de ligandos conocidos

Como se ha mencionado previamente, derivados polibromados de origen marino han demostrado capacidad moduladora de la $[Ca^{2+}]_c$ mediante el bloqueo de los CCDV del subtipo L, en músculo liso de aorta de rata ^[242]. En base a sus estructuras de *N,N*-dimetil-1-(2,5,6-tribromo-1-metil-1*H*-indol-3-il)metanamina (Figura 28 del apartado VIII. 1. 1.1, compuesto 10) y 1-(5,6-dibromo-1,2-dimetil-1*H*-indol-3-il)-*N,N*-dimetilmetanamina (Figura 28 del apartado VIII. 1. 1.1, compuesto 11), se propuso la introducción de un átomo de bromo en posición C5 del anillo indólico, dando lugar a la familia denominada *Derivados Bromados*.

Un número significativo de fármacos utilizados en la clínica poseen estructuras halogenadas, como por ejemplo el escitalopram, la flunarizina, la clorpromazina o el bromazepam. Clásicamente, los halógenos se introducían en los compuestos *hit* o los cabezas de serie con el fin de explotar sus efectos estéricos, dado que estos voluminosos átomos confieren a las moléculas cambios conformacionales y volumétricos, capaces de, por ejemplo, ocupar cavidades hidrófobas presentes en las dianas, aumentando así su afinidad por ellas y la potencia del compuesto ^[261]. Más recientemente, se ha descubierto que los halógenos también son capaces de establecer interacciones intermoleculares con las dianas, los llamados enlaces de halógeno, que contribuyen a favorecer la estabilidad de los complejos ligando-proteína y aumentar así la potencia ^[261]. Se trata de interacciones de tipo electrostático, donde hay una transferencia de carga desde un oxígeno, nitrógeno o azufre (base de Lewis) a un átomo de halógeno (ácido de Lewis) ^[262]. Por otro lado, la introducción de grupos halogenados presenta una serie de ventajas adicionales como, por ejemplo, el aumento de la estabilidad metabólica, ya que los enlaces carbono-halógeno no son metabolizados por el citocromo P450, ofreciendo una posible estrategia para bloquear una posición metabólicamente lábil. Además, también incrementan la lipofilia y la permeabilidad de las membranas biológicas, por lo que mejoran la absorción oral y el paso de la barrera hematoencefálica ^[261].

No obstante, el bromo es un sustituyente poco utilizado, puesto que su presencia en algunos compuestos ha sido asociada con toxicidad génica, por lo que habitualmente se utiliza su bioisómero cloro ^[263]. El concepto de isómero fue formulado por Irving Langmuir, en 1919 ^[264],

e incluye a aquellas moléculas o iones con el mismo número de átomos y/o el mismo número de electrones de valencia, los cuales presentan propiedades físicas similares. Posteriormente, en 1930, Hans Erlenmeyer amplió el concepto a bioisótero, el cual hace referencia a compuestos estructuralmente diferentes pero reconocidos de manera similar por los sistemas biológicos. Son grupos que poseen formas y volúmenes moleculares casi idénticos, con aproximadamente la misma distribución de electrones y propiedades físicas, de manera que ejercen efectos biológicos similares ^[265]. Actualmente, en la práctica de la química médica, la aplicación de sustituciones por grupos bioisóteros es una estrategia fundamental en el diseño y optimización de compuestos. Manteniendo unos efectos biológicos similares, se introducen cambios estructurales que pueden ser beneficiosos para mejorar la potencia o la selectividad, modificar propiedades farmacocinéticas como la absorción o la estabilidad metabólica, o reducir la toxicidad ^[265]. Generalmente, la halogenación se realiza sobre anillos aromáticos, siendo el flúor el más utilizado, seguido del cloro (Figura 38) ^[261]. El flúor es el más utilizado por ser el de menor radio atómico y un bioisótero del hidrógeno, proporcionando una mayor estabilidad metabólica, menor pKa o mayor lipofilia, sin afectar a la actividad biológica del compuesto. El yodo sólo se encuentra en la hormona tiroidea tiroxina. El bromo y el cloro son bioisóteros, pero teniendo en cuenta el riesgo de toxicidad del bromo, el cloro es el más utilizado. Es por este motivo, que una segunda familia de compuestos son los llamados *Derivados Clorados*, que presumiblemente mantendrán las propiedades farmacológicas de la familia de *Derivados Bromados* pero con menor toxicidad.

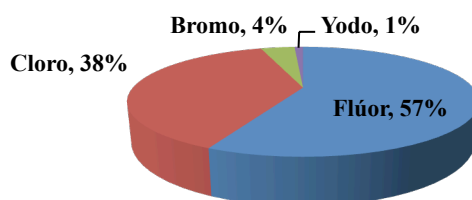


Figura 38. Clasificación de los fármacos aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA), entre 1988 y 2006, según el tipo de halógeno que contienen. Modificado de Zaldini-Hernandez y col., 2010.

Continuando con la estrategia basada en isómeros, un bioisótero del benceno es la piridina, cuyo nitrógeno presenta la ventaja de poder establecer una nueva interacción con la diana. Así, surgió la familia de *Derivados Piridínicos* (1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridina). Este tipo de sustitución de un CH bencénico por un nitrógeno es una estrategia clásica en la literatura, utilizada principalmente con el objetivo de disminuir la hidroxilación del anillo aromático y su posterior metabolismo ^[265]. Un buen ejemplo de esto es el nifedipino, el cual sufre, *in vivo*, un rápido efecto de primer paso hepático, oxidándose el núcleo de dihidropiridina a la piridina, que es

inactiva. La sustitución por el bioisótero dihidropirimidinona hace a la molécula resistente a la oxidación, lo que ha sido utilizado para el desarrollo y optimización de antagonistas del receptor α_{1A} -adrenérgico con núcleo de dihidropiridinas (Figura 39) ^[265].

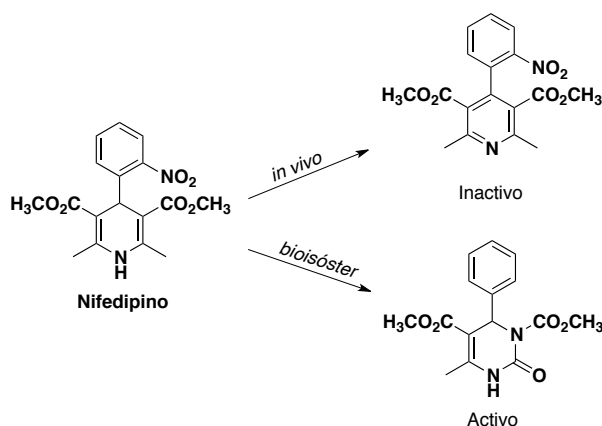


Figura 39. Estrategia basada en bioisósteros para aumentar la estabilidad metabólica del nifedipino.

Como se ha explicado en el apartado de IV. 2.2.3.1., las aminas catiónicas son compuestos capaces de mantener la actividad fosfatasa de la enzima PP2A ^{[99] [259]}. Dado que la dimetilamina presente en la gramina cumple este requisito, todos los derivados han sido diseñados para mantener dicha característica de amina terciaria ionizada a pH fisiológico, ya sea en forma de dimetilamina o piperidina. La piperidina aporta un grupo más voluminoso e hidrófobo, lo cual es de interés dado que se busca favorecer interacciones hidrofóbicas con una cavidad concreta de PP2A, como se expone en el próximo apartado.

Por último, continuando con la estrategia de diseño de derivados basada en la estructura de ligandos conocidos, el grupo *N*-propargilamina resultó de gran interés. Se encuentra presente en numerosos fármacos neuroprotectores como el ladostigil, la rasagilina y la selegilina, confiriendo a las moléculas numerosas propiedades beneficiosas como la inhibición de las enzimas óxido nítrico sintasas (endotelial e inducible) ^[266], la activación de la vía PKC-MAP cinasas y el aumento de factores neurotróficos, ambos relacionados con la supervivencia neuronal ^{[267] [268]}, el aumento de sinaptotagmina IV en el hipocampo, relacionado con la plasticidad sináptica ^[269]. De hecho, es un grupo funcional presente en muchas de las moléculas multidiana sintetizadas o evaluadas en el IFTH, y que han mostrado numerosas propiedades beneficiosas como la protección frente a la toxicidad por el βA , la R/O o el AO ^{[270] [271, 272]}.

2.3. Diseño de nuevos derivados mediante técnicas de docking o anclaje molecular

Las técnicas de *docking* son ampliamente utilizadas en las fases de identificación, diseño y optimización de los compuestos *hit* y cabezas de serie, incluso previamente a la síntesis

química, si la estructura diana es conocida. Permiten la identificación del modo de unión, es decir, la orientación y la conformación o pose que el ligando adopta en la cavidad de la proteína [168]. Los programas de *docking* realizan una exploración exhaustiva de las posiciones relativas ligando-proteína, evaluando las interacciones intermoleculares en cada posición estudiada, obteniéndose como resultado las funciones de energía, que permiten evaluar cual de las conformaciones es más estable. Para el diseño de derivados capaces de modular la actividad Ser/Thr fosfatasa, se analizó la interacción de la gramina con el modelo tridimensional de la enzima fosfatasa PP2A, mediante técnicas de *docking*, con el objetivo de introducir modificaciones estructurales encaminadas a mejorar la afinidad del ligando por la proteína. Debido a la menor relevancia de PP1 en la desfosforilación de la proteína tau, dicho estudio sólo se realizó con PP2A. Esta técnica no es aplicable al diseño de derivados capaces de actuar sobre los CCDV, ya que dichos canales no se encuentran cristalizados, por lo que no se dispone de su estructura tridimensional. Si bien farmacóforos desarrollados por D. J. Triggle, en base a técnicas indirectas de QSAR, ofrecen una aproximación válida, ésta se encuentra limitada al diseño de análogos de dihidropiridina [273].

Como se ha explicado en el apartado *VIII. 1. 1.3.*, los derivados de gramina tienen como objetivo interaccionar con la cavidad hidrofóbica presente en PP2Ac que la distingue del resto de PPP, formada por los aminoácidos Gln 122, Ile 123, His 191 y Trp 200. Al realizar el *docking* dirigido al bolsillo de unión del AO, se observa cómo la gramina se une precisamente a dicha cavidad hidrofóbica, interaccionando con los residuos Pro 190, His 191 y Trp 200 (Figura 40) y manteniéndose alejada del sitio catalítico, presumiblemente sin afectar a su actividad fosfatasa. Por tanto, resulta razonable la hipótesis de que la introducción de sustituyentes de naturaleza hidrófoba pueden favorecer nuevas interacciones con el resto de aminoácidos de la cavidad (Gln 122 e Ile 123), o incluso con otros circundantes, como ya lo hace gramina con la Pro 190. Bajo dicha premisa, se propusieron los siguientes sustituyentes para la alquilación del nitrógeno indólico: bencilo, butilo, Cl-butilo y butirato de etilo. Todos ellos aumentan la lipofilia de los derivados, así como las probabilidades de establecer nuevas interacciones con zonas hidrofóbicas de la enzima. Además, el grupo Cl-butilo ofrece la posibilidad de ser funcionalizado, lo cual se aprovechó para introducir una segunda amina terciaria, la piperidina, para así obtener derivados doblemente ionizados a pH fisiológico, con el interés que esto conlleva para el estudio de su actividad sobre la activación de PP2A.

Por último, en la posición C5 del anillo indólico se planteó la introducción de un grupo metilo, igualmente de naturaleza hidrofóbica como los halógenos pero incapaces de formar enlaces de hidrógeno débiles o de halógeno, dando lugar a la familia de *Derivados Metilados*. Con fines

comparativos y por analogía con gramina, también se incluyó una familia carente de sustituciones en el anillo bencénico, denominada *Derivados no sustituidos*.

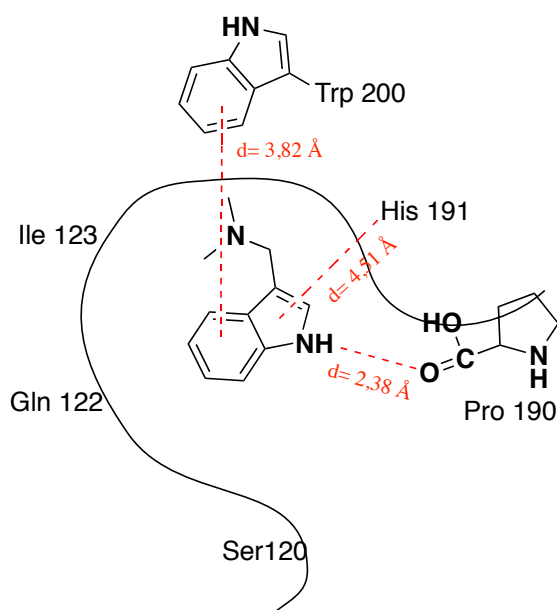


Figura 40. Esquema simplificado de la interacción de la gramina con los aminoácidos de la cavidad hidrofóbica de PP2Ac.

En resumen, los derivados de gramina con estructura indólica se pueden agrupar, según su sustituyente en posición C5, como *Derivados no sustituidos*, *Derivados Bromados*, *Derivados Clorados* y *Derivados Metilados*. Los derivados con estructura de 1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridina se clasifican como *Derivados Piridínicos*, con dos posibles sustituyentes en C5, un bromo o un grupo metoxilo. Dicho grupo metoxilo presenta las mismas cualidades que el metilo pero con la posibilidad adicional de establecer un nuevo enlace de hidrógeno (Figura 41).

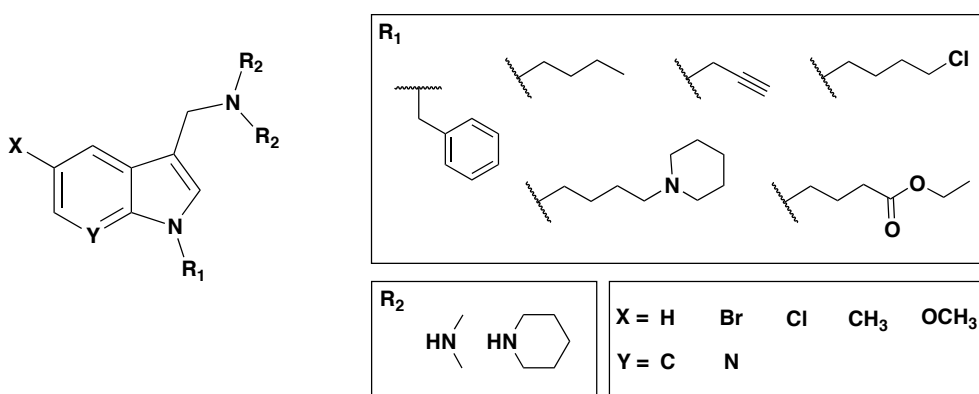


Figura 41. Modificaciones químicas propuestas sobre la estructura de gramina para el diseño de los derivados objeto de esta Memoria de Tesis.

2.4. Conclusiones parciales

En base a la estructura de ligandos conocidos y a estudios de *docking* con PP2Ac, se propusieron las siguientes modificaciones químicas sobre la estructura de gramina:

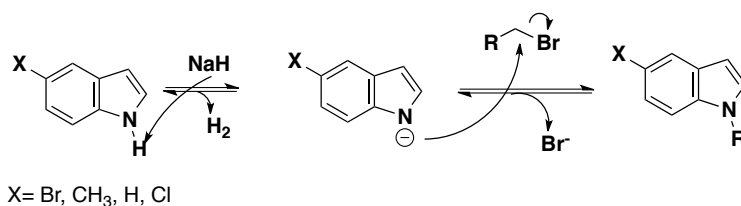
- Nitrógeno indólico: alquilación con bencilo, butilo, Cl-butilo y butirato de etilo, con el objetivo de aumentar la lipofilia de las moléculas y favorecer nuevas interacciones hidrofóbicas con PP2Ac. Alquilación con el grupo propargilamina, con el objetivo de mejorar las propiedades neuroprotectoras, y con butilpiperidina, para mejorar la actividad sobre PP2A.
- Amina terciaria: conservación de la amina ionizada a pH fisiológico en forma de dimetilamina, al igual que la propia gramina, o de piperidina, grupo más voluminoso y con carácter hidrófobo para propiciar nuevas interacciones con la enzima fosfatasa.
- Anillo bencénico: mantenimiento de la estructura indólica con sustituciones en posición C5 del anillo bencénico (Br, Cl o CH₃), o cambio del heterociclo a por un 1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridina, con un Br o CH₃O en posición C5.

3. SÍNTESIS ORGÁNICA Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS DERIVADOS DE GRAMINA

Para la síntesis de los derivados de gramina se partió de sustancias comerciales con el sustituyente deseado en posición C5, a partir de los cuales se obtuvieron los derivados deseados en dos o tres pasos sintéticos.

3.1. *N*-alquilación de 5-bromo-1*H*-indol (**a**), 5-metil-1*H*-indol (**b**), 1*H*-indol (**c**) y 5-cloro-1*H*-indol (**d**)

La reacción de *N*-alquilación se llevó a cabo mediante sustitución nucleófila sobre haluros de alquilo, en presencia del NaH como base (Esquema 1) ^[185]. Se trata de una sustitución nucleófila bimolecular (S_N2), posterior a la desprotonación del nitrógeno indólico. La base NaH arranca el protón del nitrógeno pirrólico, produciéndose evolución de hidrógeno gas. Es un proceso que requiere 2 h de reacción, pero que en el caso de los indoles con sustituyentes electroatrayentes en posición 5 (Br o Cl, precursores **a** y **d**, respectivamente), se reduce a 1 h, presumiblemente porque la retirada de carga ejercida por el halógeno sobre el heterociclo facilita su desprotonación por el NaH. El amiduro formado ataca al carbono unido al halógeno, deficiente en carga electrónica por el efecto electroatrayente de éste. La reacción cursó a temperatura ambiente y en 2-4 h, a excepción de la reacción para la obtención del intermedio **a4**, que necesitó 24 h. Así, se obtuvieron los productos intermedios **a1-5**, **b1-5**, **c1-3** y **d1-3**, sin necesidad de purificación posterior y con rendimientos altos, a excepción del compuesto **a4** (Tabla 2).



Esquema 1. Mecanismo de reacción para la reacción de *N*-alquilación.

	a1	a2	a3	a4	a5	b1	b2
R	Bn	<i>n</i> -Bu	CH ₂ C≡CH	-(CH ₂) ₃ CO ₂ Et	-(CH ₂) ₄ Cl	Bn	<i>n</i> -Bu
Rto	> 99 %	94 %	> 99 %	36 %	> 99%	> 99%	82 %

	b3	b5	c1	c2	c3	d1	d2	d3
R	CH ₂ C≡CH	-(CH ₂) ₄ Cl	Bn	<i>n</i> -Bu	CH ₂ C≡CH	Bn	<i>n</i> -Bu	CH ₂ C≡CH
Rto	> 99 %	> 99 %	> 99 %	92 %	87 %	93 %	95 %	98 %

Tabla 2. Rendimientos correspondientes a la reacción de *N*-alquilación sobre los precursores **a** (X = Br), **b** (X = CH₃), **c** (X = H) y **d** (X = Cl).

El par de electrones no enlazantes del nitrógeno indólico carece del suficiente carácter nucleófilo para dar lugar a la reacción, ya que contribuye a la aromaticidad del ciclo, según la regla de Hückel, que argumenta que una molécula plana es aromática si tiene $4n+2$ electrones π . Así, se hace necesario el paso previo de desprotonación.

Debido a la dificultad para eliminar a vacío el disolvente de la reacción, DMSO, se probaron distintas alternativas compatibles con las reacciones de desprotonación y de sustitución nucleófila (no prótico, polar). La sustitución de DMSO por acetonitrilo o dimetilformamida (DMF) produjo una ligera reducción de los rendimientos ($\approx 85\%$) que no compensaba su utilización en vez de DMSO, por lo que este se mantuvo como disolvente de elección, empleándose la mínima cantidad posible y, para su eliminación una vez terminada la reacción, se destiló en evaporador rotatorio a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y con corriente de vapor a 120 mbares de presión. Aun así, en algunos casos se tuvo que recurrir a una purificación por cromatografía flash automatizada para su completa eliminación.

Ninguna alternativa experimental mejoró el rendimiento obtenido para la formación del producto intermedio **a4**, ya sea por sustitución de la base (KOH), cambios en el disolvente de reacción (DMF, acetonitrilo, THF, acetona), uso de catalizador de transferencia de fase, o variación de condiciones de reacción (número de equivalentes de los reactivos, tiempo de reacción o temperatura) ^[274] ^[275] ^[276]. Acompañando a un bajo grado de conversión, requirió de una complicada purificación debido a la dificultad de monitorizar el reactivo 4-bromobutirato de etilo, que no absorbe a las longitudes de onda de la lámpara de UV (254 y 365 nm) y que tampoco reveló en ninguna de las diferentes tinciones utilizadas habitualmente. La reacción de 4-bromobutirato de etilo con el 5-metil-1-*H*-indol condujo a la formación del producto alquilado esperado, pero con una conversión del 10 %. Debido a las dificultades encontradas, no se sintetizó ningún derivado de gramina, a parte del bromado en C5, con el sustituyente butirato de etilo en posición *N*₁.

La formación de los intermedios **a3**, **b3**, **c3** y **d3**, y los productos finales **8**, **9**, **20** y **21**, todos con el grupo propargilo como sustituyente ($R = \text{C}\equiv\text{CH}$), ha presentado diversas complicaciones. Todos ellos se descompusieron al tratar de ser purificados mediante cromatografía en columna flash automatizada. Además, mediante espectrometría de RMN de ^1H , se pudo confirmar la parcial descomposición del bromuro de propargilo en el correspondiente aleno, mostrando un doblete a aproximadamente 5,5 ppm, correspondiente al CH_2 terminal, y un triplete a 6,90 ppm, correspondiente al CH, ambos acoplados entre sí con una constante de 6,5 Hz. Dicho aleno también es susceptible de reaccionar con el indol, disminuyendo el rendimiento del producto deseado debido a la formación del subproducto 1-(buta-2,3-dien-1-il)-1*H*-indol. No obstante, el

aumento de los equivalentes utilizados del electrófilo de 1,2 a 1,4 llevó a la obtención de los productos intermedios con rendimiento cuantitativo. Se propuso la protección del grupo propargilo de estos intermedios con tert-butildifenilsilano (TBDPS), previo a la formación de los productos finales para evitar posibles problemas debidos al medio ácido característico de las condiciones de Mannich, a través de un protocolo sintético clásico de protección de alquinos terminales con haluros de alquilsilano ^[277]. Si bien la posterior reacción de Mannich y su purificación fueron exitosas, cuando se intentó la desprotección del grupo propargilo mediante TBAF en THF seco a 0 °C ^[278], la purificación del producto desprotegido provocó su descomposición, por lo que se descartó esa vía de síntesis.

En base a los datos espectrales de RMN de ¹H pertenecientes a los compuestos intermedios **a1-5**, **b1-3**, **b5**, **c1-3** y **d1-3**, la señal inequívoca que confirma su formación es la desaparición del singlete ancho entorno a 8,3–10,3 ppm, correspondiente al NH indólico, así como la aparición de las señales correspondientes a los sustituyentes introducidos.

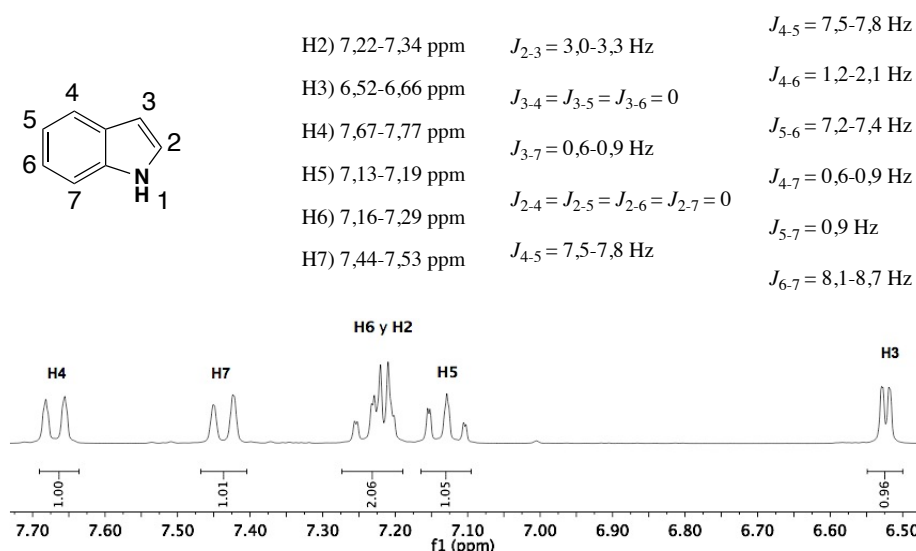


Figura 42. Desplazamientos químicos (ppm), constantes de acoplamiento (J) y asignación de los protones aromáticos de la familia de *Derivados no sustituidos*. Fragmento de espectro perteneciente al producto intermedio **c2**.

Existen particularidades espectrales comunes en todos estos productos intermedios. En la Figura 42, se describen los intervalos de desplazamiento químico para cada protón aromático, así como sus constantes de acoplamiento y la asignación correspondiente, tomando como ejemplo la gramina y los *Derivados no sustituidos*. Análogamente a lo descrito y tabulado para alquenos endocíclicos, la esperable constante de acoplamiento entre H2 y H3, que en alquenos abiertos suele ser 5-12 Hz, se reduce hasta aproximadamente 3 Hz. Sorprendentemente, existe un acoplamiento entre H3 y H7 (y no entre H3 y H4), el cual se pierde en la familia de *Derivados*

Piridínicos, como se detallará más adelante. La señal correspondiente al protón H3 es la más apantallada, por efecto de la tautomería imina-enamina que hace que el carbono C3 presente mayor densidad electrónica, apantallando al protón H3.

Si bien la modificación más evidente al introducir un sustituyente en C5 es la desaparición del protón correspondiente (H5), también los protones en posiciones *orto* (H4 y H6) se ven modificados, como era de esperar. El átomo de bromo produce un desapantallamiento de unos 0,2 ppm^[279], es decir, que los protones en posición *orto* se verán desplazados ligeramente hacia campo bajo. Así, el H4 pasa a encontrarse entre 7,75-7,79 ppm y el H6 entre 7,27-7,35 ppm. También la multiplicidad de las señales se ve afectada, pasando el H4 de ser un doblete de dobletes a un doblete o doblete ancho, y el H6 de un doblete de dobletes a un doblete de dobletes (Figura 43).

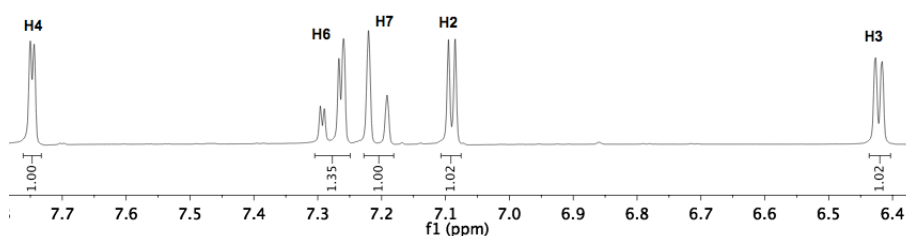


Figura 43. Asignación de los protones aromáticos de la familia de *Derivados Bromados*. Fragmento de espectro perteneciente al producto intermedio **a2**.

A pesar de que se esperaría que el átomo de cloro desapantallara 0,3 ppm a hidrógenos situados en posiciones *orto*, no se llega a apreciar un desplazamiento en las señales correspondientes a los protones H4 y H6, aunque sí se modifica la multiplicidad de sus señales, al igual que ocurre en derivados bromados (Figura 44).

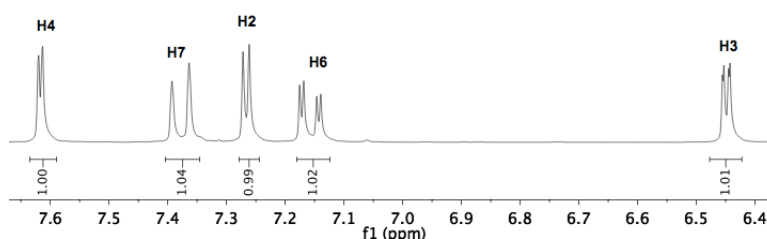


Figura 44. Asignación de los protones aromáticos de la familia de *Derivados Clorados*. Fragmento de espectro perteneciente al producto intermedio **d2**.

Por último, el sustituyente CH₃, presente en los precursores e intermedios del tipo **b**, induce un apantallamiento de 0,20 ppm de los hidrógenos en *orto*, lo cual afecta significativamente a los protones H4 y H6, que se desplazan entre 7,38-7,51 y 6,96-7,16 ppm, respectivamente. Además, la multiplicidad de H4 es característica, pasando de ser un doblete de dobletes a un

multiplete, puesto que es capaz de acoplarse con los tres protones del grupo metilo (Figura 45). Esta familia se diferencia de las demás por la existencia de un singlete aparecido entre 2,39 y 2,44 ppm, señal correspondiente al grupo metilo.

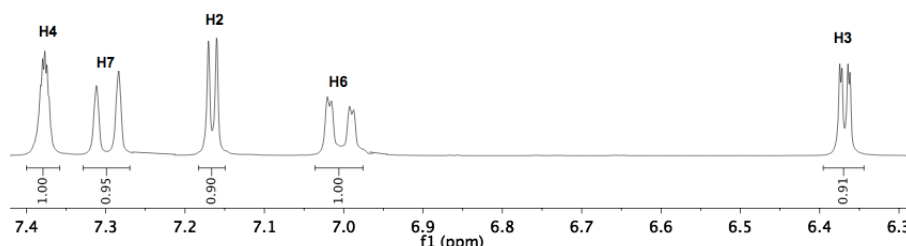


Figura 45. Asignación de los protones aromáticos de la familia de *Derivados Metilados*. Fragmento de espectro perteneciente al producto intermedio **b2**.

En relación a los sustituyentes introducidos mediante la reacción de *N*-alquilación, todos comparten un CH₂ unido al nitrógeno indólico, desplazado a un campo bajo alifático por la unión al nitrógeno y que, dependiendo de si está unido a alquilo, alquino o a fenilo, se desapantallará un poco más ^[279]. Así, la señal correspondiente a dicho CH₂ aparece aproximadamente a 4,12 ppm en el caso de alquilos (derivados **a2**, **a4**, **a5**, **b2**, **b5**, **c2** y **d2**), a 4,88 ppm en alquinos (derivados **a3**, **b3**, **c3** y **d3**) y 5,33 ppm en fenilos (derivados **a1**, **b1**, **c1** y **d1**).

En el espectro de RMN de ¹H de las moléculas que presentan un grupo butilo, aparecen cuatro sistemas a campo alto fácilmente asignables, en función de la multiplicidad de las señales y su desplazamiento químico. Como se observa en la Figura 46 (arriba), el triplete más desapantallado corresponde al metileno “A” por estar unido al nitrógeno indólico. El segundo triplete corresponde a “D”, por integrar para tres protones y ser un claro triplete. La señal correspondiente a “B” aparece como un quintuplete, debido a los cuatro protones vecinales con los que se acopla con muy parecidas constantes de acoplamiento. Por último, la señal de “C” es un sextuplete, esperable para hidrógenos que se acoplan con cinco protones con similar constante de acoplamiento. Por otro lado, en las moléculas **a5** y **b5**, que presentan el sustituyente 4-clorobutilo, la señal “D” se desplaza hacia la izquierda por el efecto desapantallante del cloro, pero en este caso los multipletes “B” y “C” son de difícil asignación (Figura 46, abajo).

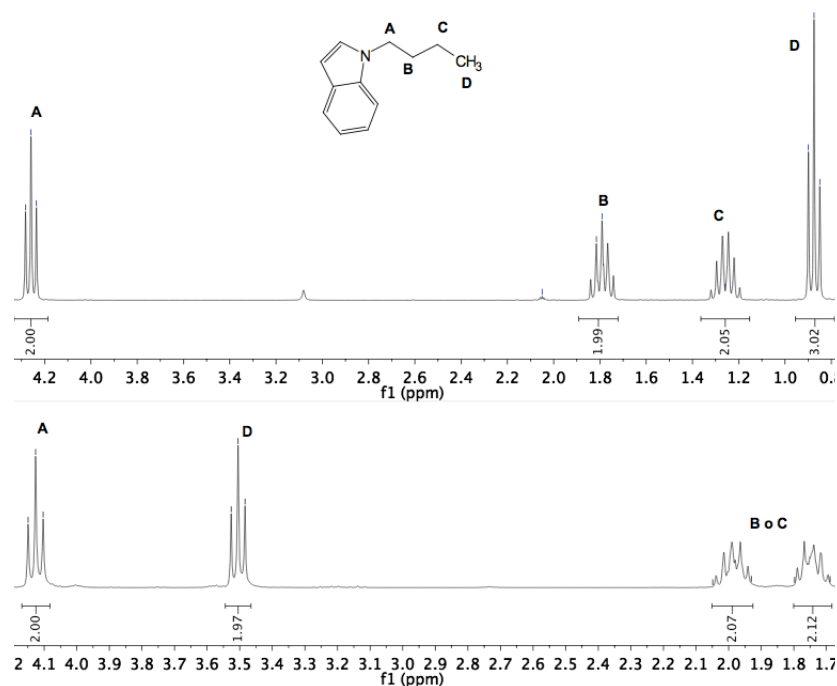


Figura 46. Arriba, asignación de los protones alifáticos correspondientes el sustituyente butilo. Fragmento de espectro perteneciente al producto intermedio **e2**. Abajo, asignación de los protones alifáticos correspondientes al sustituyente 4-clorobutilo. Fragmento de espectro perteneciente al producto intermedio **a5**.

El grupo propargilo muestra una señal correspondiente al hidrógeno terminal, aproximadamente a 2,90 ppm, desdoblada a triplete por acoplamiento lejano con el CH₂ unido al nitrógeno indólico, gracias a que el triple enlace supone una distancia de enlace más corta (1,20 Å), que la existente en enlaces sencillos con hibridación sp₃ (1,54 Å). Las señales de RMN de ¹H correspondientes al sustituyente butirato de etilo son fácilmente asignables en función de la multiplicidad de las señales y el desapantallamiento inducido por el nitrógeno indólico y el grupo éster (Figura 47).

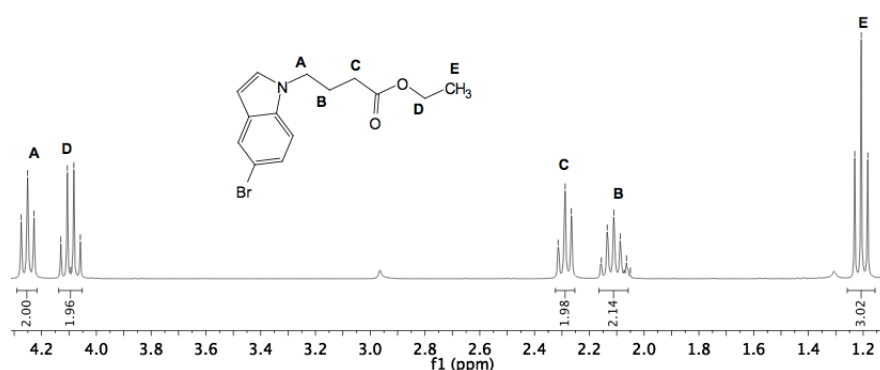
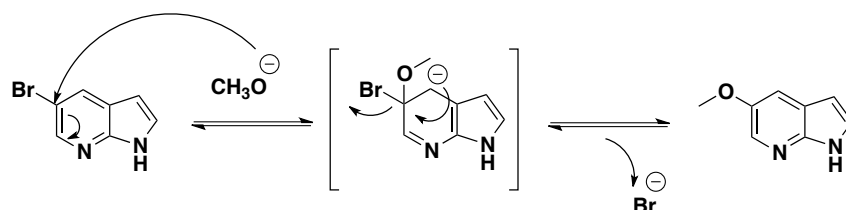


Figura 47. Asignación de los protones alifáticos correspondientes al sustituyente butirato de etilo. Fragmento de espectro perteneciente al producto intermedio **a4**.

3.2. Síntesis de 5-metoxi-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridina (**f**)

El producto intermedio **f** se sintetizó a partir del 5-bromo-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridina (producto comercial), mediante una sustitución nucleófila aromática (S_NAr). Dicha halopiridina ofrece las condiciones propicias para este tipo de reacción, dado que los haluros son buenos grupos salientes y que tanto el nitrógeno como el bromo son átomos fuertemente electrón atrayentes, capaces de disminuir la densidad electrónica del anillo, haciéndolo más susceptible al ataque de nucleófilos fuertes. Mediante un mecanismo de adición-eliminación, el nucleófilo CH_3O^- se une al carbono unido al bromo retrayéndose el doble enlace, siendo el halógeno desplazado para recuperar la aromaticidad del heterociclo (Esquema 2).



Esquema 2. Mecanismo de reacción para la reacción de S_NAr para la formación de 5-metoxi-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridina (**f**).

Respecto a los espectros de RMN de 1H , la parte aromática de los compuestos pertenecientes a la familia de *Derivados Piridínicos* difiere significativamente respecto a la de los compuestos con estructura indólica, no solo por la desaparición de la señal correspondiente al H7, sino porque además H6 y H4 se encuentran muy desapantallados, debido al efecto del nitrógeno piridínico (Figura 48).

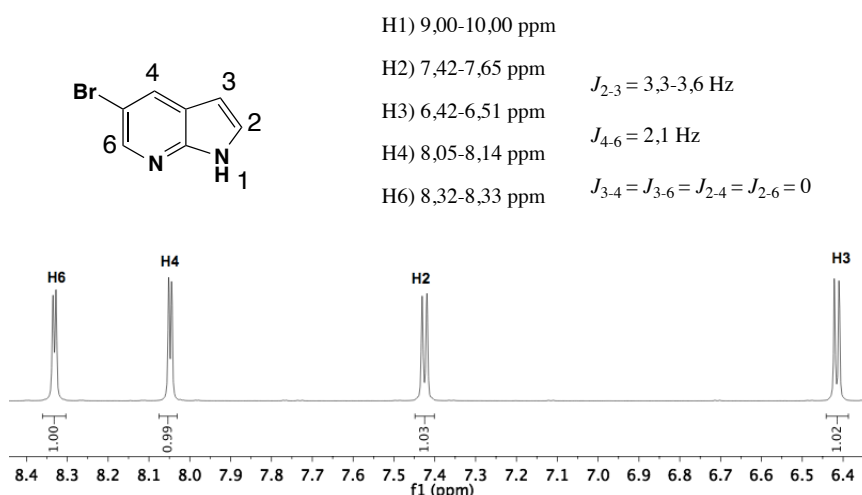


Figura 48. Desplazamientos químicos (ppm), constantes de acoplamiento (J) y asignación de los protones aromáticos de la familia de *Derivados Piridínicos*. Fragmento de espectro perteneciente al producto intermedio **e2**.

La formación del producto intermedio **f** queda confirmada por la aparición del singlete correspondiente al CH₃ del grupo metoxilo (aproximadamente a 3,84 ppm), así como el apantallamiento de la señal correspondiente al H4 y el ensanchamiento de la señal del H6, ambos provocados por la presencia del grupo metoxilo en posición *orto* (Figura 49).

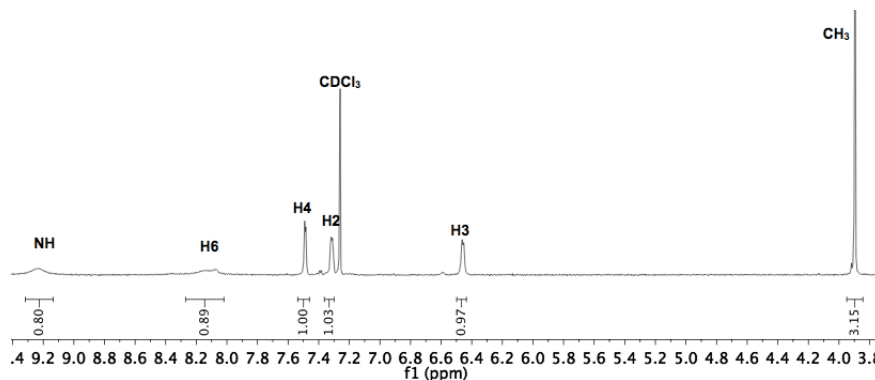


Figura 49. Asignación de los protones correspondientes al producto intermedio **f**.

3.3. *N*₁-alquilación de las 1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridinas **e** y **f**

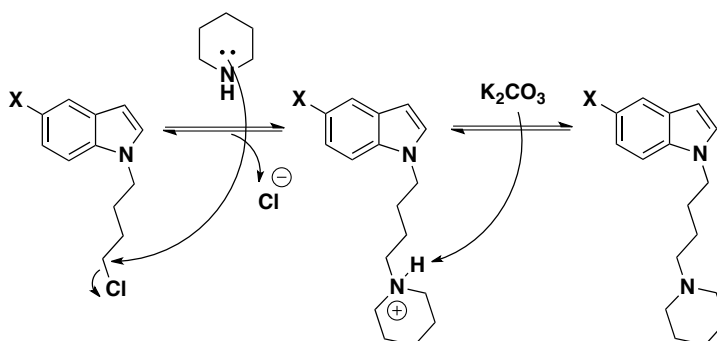
Para la *N*₁-alquilación de los *Derivados Piridínicos* se propuso utilizar un protocolo diferente, descrito por García-Frutos y col. (2008), usando KOH como base y acetona como disolvente, facilitando la disolución del amiduro la presencia del catalizador de transferencia de fase [CH₃(CH₂)₃]₄N(HSO₄). En estas condiciones menos agresivas, se obtuvieron, tras una purificación, los productos intermedios **e1**, **e2** y **f1**, con rendimientos cuantitativos, con la excepción de **e3**, cuyo rendimiento disminuyó significativamente (53 %) por la descomposición del bromuro de propargilo anteriormente comentada, y posiblemente incrementada por pirolisis bajo las condiciones de reacción (75 °C). Cuando el precursor **e** se sometió a las condiciones previas de *N*-alquilación con NaH, igualmente se consiguieron los productos intermedios **e1** y **e2** con rendimientos cuantitativos y sin necesidad de purificación.

Las señales encontradas en los espectros de RMN de ¹H están en consonancia con los productos intermedios ya descritos en los apartados 3.1. y 3.2. que presentan las mismas sustituciones.

3.4. Preparación de los 4-[(piperidin-1-il)butil]indoles **a6** y **b6**

La sustitución nucleófila sobre el 1-cloro-4-iodobutano, que conduce a la formación de los *N*-(4'-clorobutil)indoles **a5** y **b5**, permite incorporar piperidina como sustituyente con un puente alquílico sobre el nitrógeno indólico, mediante ataque nucleófilo (S_N2) sobre el carbono unido al halógeno, usando K₂CO₃ como base (Esquema 3) ^[195]. su purificación, se obtuvieron

los productos intermedios **a6** y **b6** con rendimientos moderados (60 y 45 % respectivamente). Se confirma su formación en los espectros de RMN de ^1H por aparición de las señales correspondientes a los hidrógenos de la piperidina, H2' a 2,33-2,19 ppm (más desapantallados por su proximidad al nitrógeno) y H3'-H4', a 1,57-1,28, ppm con una intensidad relativa para 6 hidrógenos. Además, el metileno previamente unido a Cl se desplaza a campo alto por la nueva sustitución por el nitrógeno piperidínico (de 3,50 ppm a 2,25 ppm), solapándose con el multiplete correspondiente a H2'. Se exploró la opción de funcionalizar el 4-clorobutilo sobre productos de la reacción de Mannich, que llevan la posición C3 ya sustituida, pero no se consiguió el producto deseado.



Esquema 3. Mecanismo de reacción para la reacción de $\text{S}_{\text{N}}2$ para la formación de los 4-[(piperidin-1-il)butil]indoles **a6** y **b6**.

3.5. Ruta alternativa para la síntesis de los derivados **16** y **25** mediante los intermedios *N*-óxidos **b7** y **c7**

Como se expone en el próximo apartado, la reacción de Mannich da lugar a los compuestos finales con la posición C3 sustituida por dimetilamina o piperidina. Sin embargo, este protocolo derivó en una compleja mezcla de productos para la reacción de 5-metil-1*H*-indol con piperidina. Para solventar esto, se seleccionó un método alternativo, que consiste en la generación del *N*-óxido del producto comercial 5-metil-1*H*-gramina (**15**), intermedio **b7**, que posteriormente se trató con piperidina para formar el derivado **16**, con rendimiento cuantitativo [196]. La misma estrategia se propuso para la preparación del análogo de la gramina con piperidina (**25**).

El mecanismo de oxidación para este intercambio dimetilamina/piperidina comienza con un ataque nucleófilo bimolecular del sustituyente dimetilamina sobre una molécula de H_2O_2 , dando lugar al *N*-óxido correspondiente (**b7** o **c7**) tras la desprotonación por el anión hidróxido (Esquema 4). Los cristales del *N*-óxido pueden ser aislados y, mediante RMN de ^1H , se confirma su formación por el desapantallamiento de las señales correspondientes al H2 (de 7,24

a 7,55 ppm), C3CH₂ (de 3,70 a 4,60 ppm) y (CH₃)₂ (de 2,25 a 3,10 ppm) (Figura 50, arriba y centro). Gracias a este *N*-óxido, el enlace CH₂-N se encuentra muy polarizado y es más susceptible de ser atacado por un nucleófilo, en este caso la piperidina, dando lugar a los productos finales **16** y **25** después de recristalización en etanol absoluto, con un 74 % de rendimiento final. En el espectro de RMN de ¹H de estos productos finales, se observa la recuperación del desplazamiento químico habitual de H₂ y C3CH₂, así como la desaparición de la señal correspondiente al sustituyente dimetilamino (aproximadamente a 2,5 ppm) y la aparición de las señales de la piperidina (Figura 50, abajo).

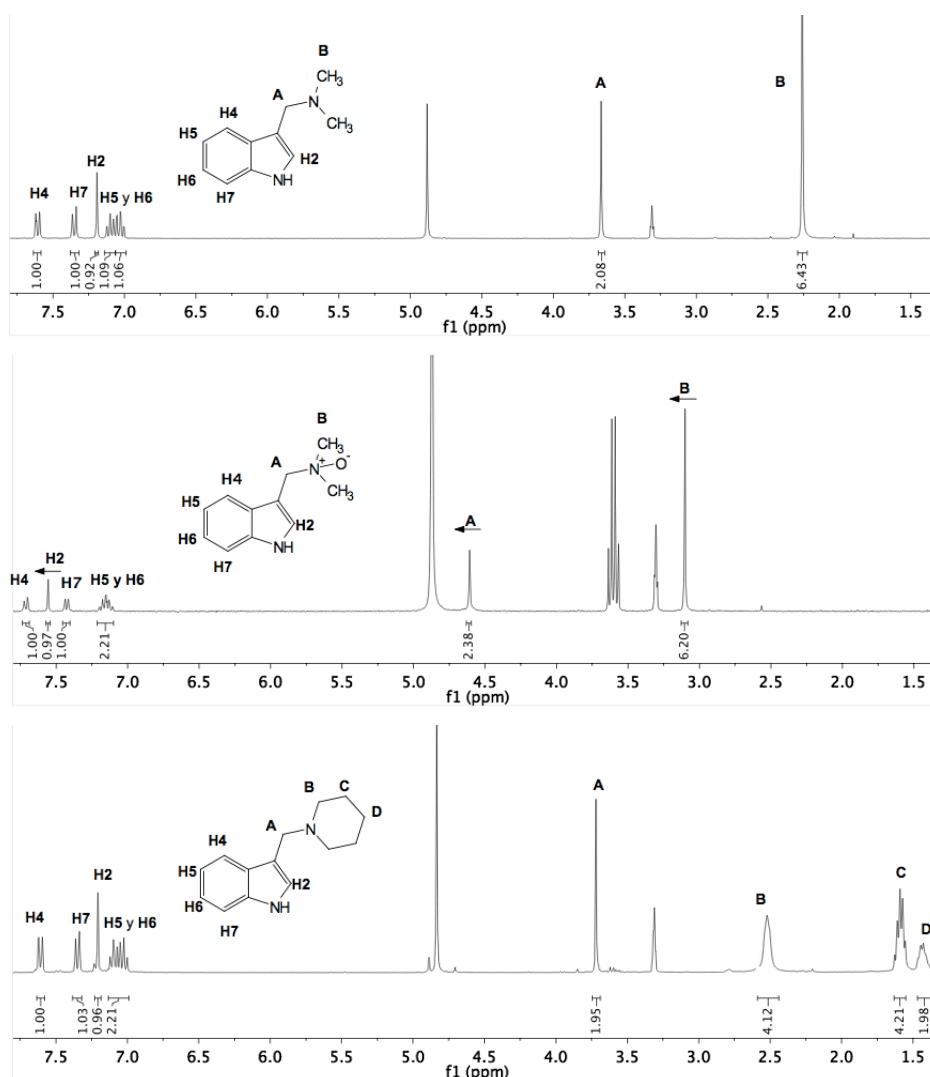
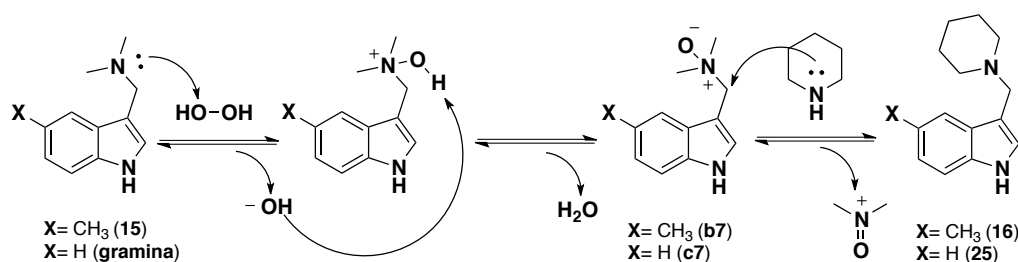


Figura 50. Cambios en el desplazamiento químico y asignación de los protones correspondientes a la gramina (arriba), al producto intermedio **c7** (centro) y al producto final **25** (abajo).

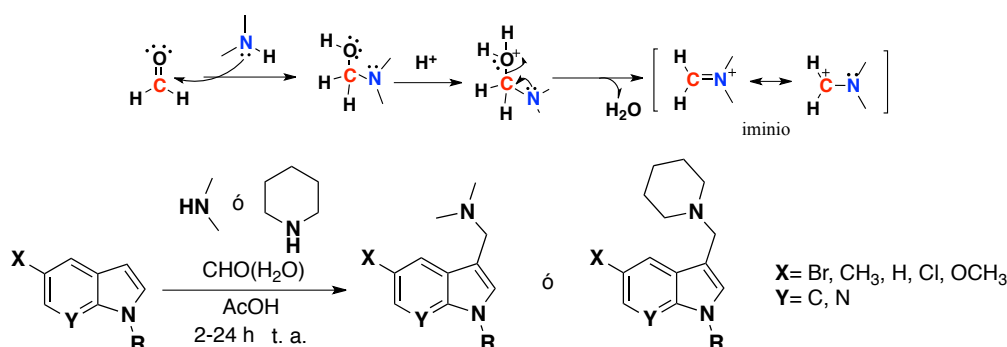


Esquema 4. Ruta alternativa para la síntesis de los derivados **16** y **25** mediante los intermedios *N*-óxidos **b7** y **c7**.

Además de esta ruta de síntesis alternativa, se exploraron otras opciones para la obtención de estos derivados. A partir del derivado metilado **18** ($R = \text{Bn}$ y piperidina sobre el C3), se intentó la hidrogenólisis del grupo bencilo ^[178], pero sin resultados óptimos. Sí que se consiguió la desprotección del grupo bencilo mediante ácido trifluorometanosulfónico en CH_2Cl_2 a reflujo, obteniéndose el producto **16**, aunque con necesidad de ser posteriormente purificado.

3.6. Reacción de Mannich para la síntesis de los derivados 2–14, 17–24 y 26–46

El último paso para la obtención de los productos finales es la reacción de Mannich ^[199]. Se trata de una reacción multicomponente, que requiere el concurso de una amina secundaria y un aldehído no enolizable, preferentemente formaldehído. En nuestro caso, el segundo nucleófilo es la enamina presente en el indol, que ataca al iminio formado de la condensación de formaldehído con la amina secundaria (dimetilamina o piperidina) (Esquema 5). Así, la enamina ataca al iminio, dando lugar a un intermedio que evoluciona hacia la aromatización mediante la salida de protón.



Esquema 5. Mecanismo propuesto para la reacción de Mannich.

De esta manera, se obtuvieron los productos finales **2-14**, **17-24** y **26-46**, con rendimientos altos (Tabla 3), excepto para el derivado **28** (34 % de rendimiento) a pesar de aumentar el tiempo de reacción hasta las 24 h para este caso. Como alternativa a este bajo rendimiento, y dado que el

producto **28** es el análogo de gramina sustituido con butilo en el nitrógeno indólico, se exploró la posibilidad de realizar la reacción de *N*-alquilación con yoduro de butilo sobre la propia gramina. Si bien se consiguió la completa conversión de la reacción, durante la purificación del crudo el rendimiento disminuyó hasta el 34 %, debido a problemas de estabilidad de los productos sustituidos en C3 que se comentarán a continuación. Por tanto, en ninguno de los casos se consiguió mejorar el rendimiento para el derivado **28**.

X= Br Y= C	2	3	4	5	6	7	8
R	H	H	Bn	Bn	<i>n</i> -Bu	<i>n</i> -Bu	CH ₂ C≡CH
R'	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	CH ₃
Rto	80 %	80 %	> 99 %	94 %	> 99 %	> 99 %	98 %

X= Br Y= C	9	10	11	12	13	14
R	CH ₂ C≡CH	-(CH ₂) ₄ Cl	-(CH ₂) ₄ Pi	-(CH ₂) ₄ Pi	-(CH ₂) ₃ CO ₂ Et	-(CH ₂) ₃ CO ₂ Et
R'	-(CH ₂) ₅ -	-(CH ₂) ₅ -	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
Rto	98 %	> 99 %	> 99 %	> 99 %	95 %	> 99 %

X= CH₃ Y= C	17	18	19	20	21	22	23	24
R	Bn	Bn	<i>n</i> -Bu	CH ₂ C≡CH	CH ₂ C≡CH	-(CH ₂) ₄ Cl	-(CH ₂) ₄ Pi	-(CH ₂) ₄ Pi
R'	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	-(CH ₂) ₅ -	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	-(CH ₂) ₅ -	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
Rto	97 %	97 %	94 %	90 %	96 %	> 99 %	91 %	96 %

X= H Y= C	26	27	28	29	30	31
R	Bn	Bn	<i>n</i> -Bu	<i>n</i> -Bu	CH ₂ C≡CH	CH ₂ C≡CH
R'	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
Rto	95 %	83 %	34 %	79 %	> 99 %	> 99 %

X= Cl Y= C	32	33	34	35	36	37	38
R	H	Bn	Bn	<i>n</i> -Bu	<i>n</i> -Bu	CH ₂ C≡CH	CH ₂ C≡CH
R'	-(CH ₂) ₅ -	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
Rto	79 %	> 99 %	91 %	> 99 %	92 %	95 %	> 99 %

X= Br	39	40	41	42	43	44	X= CH ₃ O	45	46
Y= N							Y= N		
R	Bn	Bn	n-Bu	n-Bu	CH ₂ C≡CH	CH ₂ C≡CH	R	Bn	Bn
R'	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	R'	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
Rto	> 99 %	> 99 %	93 %	> 99 %	64 %	89 %	Rto	74 %	78 %

Tabla 3. Rendimientos correspondientes a la reacción de Mannich.

Un paso clave durante la síntesis de estos derivados es el tratamiento del crudo de reacción, llevado a cabo cuando se consumió el sustrato o no evolucionó más, basado en la adición de una solución acuosa de NaOH (30 %) hasta pH 14. En los espectros de RMN de algunos derivados se observaba un desapantallamiento de las señales de los hidrógenos próximos al nitrógeno de la amina terciaria, así como un bajo rendimiento de las reacciones. El motivo resultó ser una insuficiente neutralización del medio ácido de la reacción, de manera que parte de los productos permanecían protonados, reflejándose en los espectros además de disminuir los rendimientos por quedar retenidos en la fase acuosa durante la extracción. Si se analiza el pKa de las moléculas (Figura 51, izquierda), los derivados de estructura indólica sustituidos con dimetilamina o piperidina se encuentran, en general, protonados a pH 7,4 en un 98 y 80 %, respectivamente. En el caso de los *Derivados Piridínicos*, muestran la doble protonación, en el nitrógeno de la piridina, a pH entorno a 1 (Figura 51, derecha). Así, para la síntesis de todos los derivados se determinó la necesidad de tratar las reacciones mediante solución de NaOH hasta alcanzar pH muy básicos (mínimo pH > 10), con el fin de garantizar que todas las moléculas se encontrasen neutras y pudiesen ser extraídas a la fase orgánica.

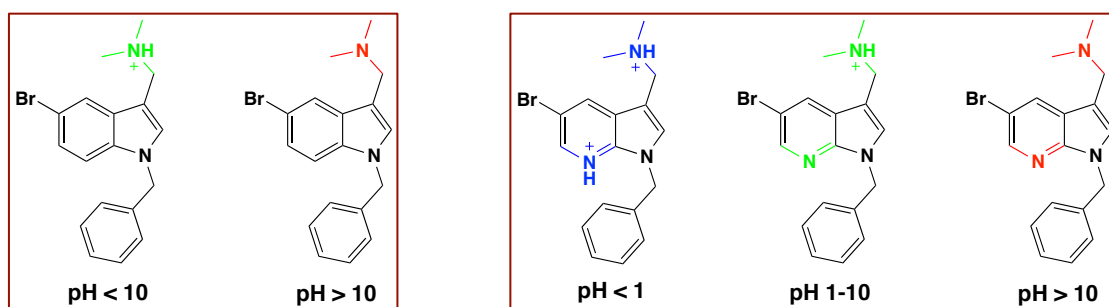


Figura 51. Especies predominante para cada molécula según el pH de la solución acuosa en el que se encuentren. Calculado con el programa Marvin Sketch 6.1.0.

El principal problema asociado al aislamiento de derivados de gramina es su delicada estabilidad química en medios acuosos ácidos ^[280] ^[232] ^[260]. Se confirmó, mediante espectrometría de RMN de ¹H, la formación de derivados de 3-metilen-3*H*-indoles como subproductos (Figura 52), tras la realización de procedimientos rutinarios como la cromatografía flash en sílica gel para la purificación de los productos o la preparación de las

muestras para RMN utilizando CDCl_3 como disolvente deuterado. Este inconveniente se solventó mediante la realización del tratamiento de los crudos de reacción a pH 14, el uso de alúmina básica tanto para la neutralización de los disolventes orgánicos utilizados (principalmente CH_2Cl_2), como para las placas de TLC y la fases estacionaria en las cromatografías en columna flash, y la preparación de los espectros de RMN en acetona deuterada. A pesar de todas estas medidas, la purificación de los productos finales mediante cromatografía en columna con frecuencia supuso con frecuencia un descenso en el rendimiento, como en el caso de los derivados **29** y **46**, cuyos rendimientos tras la purificación fueron del 78 % a pesar de la alta conversión de sus reacciones. Para evitar esto y a raíz de la observación de que algunos derivados precipitaban en los tubos de resonancia, se planteó la posibilidad de su purificación mediante trituración en disolventes orgánicos. De este modo, por ejemplo, los derivados **10** y **17** se aislaron puros del sobrenadante de su trituración en éter etílico y acetona, respectivamente.

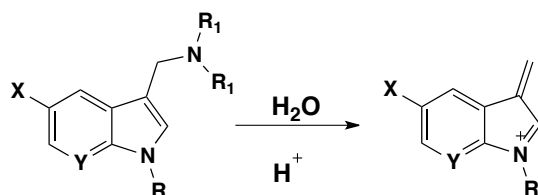


Figura 52. Descomposición de los derivados de gramina en sus correspondientes 3-metilen-3H-indoles.

En base a los datos espectrales de RMN de ^1H pertenecientes a los productos finales **2-14**, **17-24** y **26-46**, la señales inequívocas que confirman su formación son (Figuras 53 y 54):

- Desaparición de la señal correspondiente al H3 (6,52-6,66 ppm en derivados indólicos, 6,42-6,51 en derivados piridínicos).
- Cambio en la multiplicidad de H2, que pasa de doblete a singlete.
- Aparición del singlete perteneciente al grupo $\text{C3CH}_2\text{N}$ (3,52-3,63 ppm).
- Aparición de las señales correspondientes a la dimetilamina (singlete aproximadamente a 2,17-2,26 ppm) o piperidina (tres multipletes a 2,40, 1,50 y 1,50 ppm).

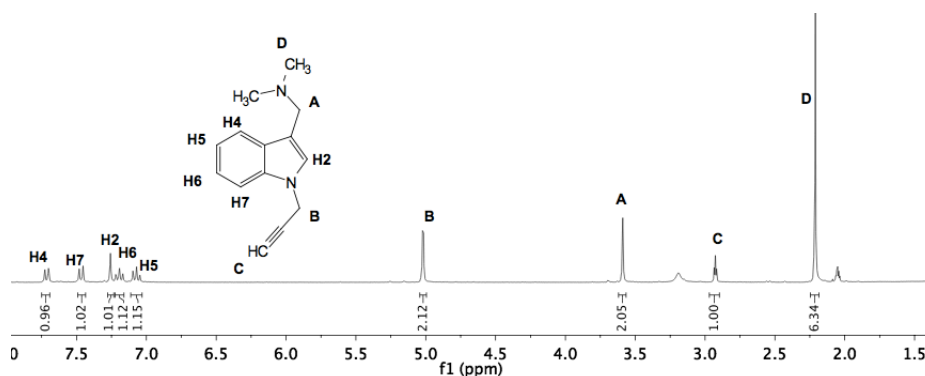


Figura 53. Asignación de los protones correspondientes al derivado **30**.

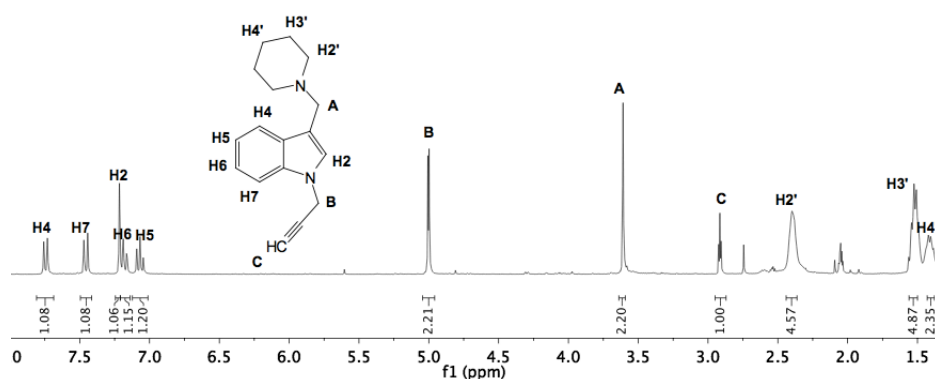


Figura 54. Asignación de los protones correspondientes al derivado **31**.

En relación a los datos espectrales de RMN de ^{13}C , la aparición de nuevas señales atribuibles a los sustituyentes introducidos confirma la formación de estos productos, siendo las señales más características las correspondientes al CH_2 unido al nitrógeno indólico (la cual aparece muy desapantallada por efecto del nitrógeno, alrededor de 35-45 ppm, y desaparece en los derivados con el nitrógeno indólico sin sustituir), el carbono entre el C3 indólico y la amina terciaria (aproximadamente 50 ppm), la señal de los carbonos del $(\text{CH}_3)_2$ de la dimetilamina (aproximadamente a 40-50 ppm y con mayor altura por corresponder a dos carbonos) y las tres señales de la piperidina (alrededor de 50, 22 y 21 ppm) (Figuras 55 y 56).

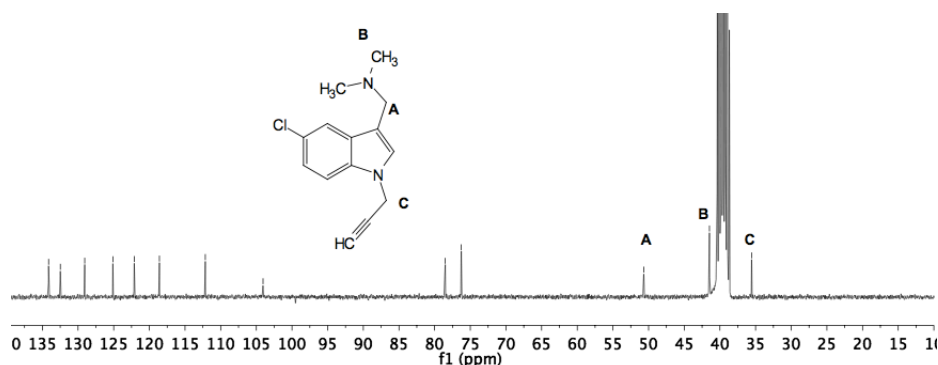


Figura 55. Asignación parcial de las señales de carbono correspondientes al derivado **37**.

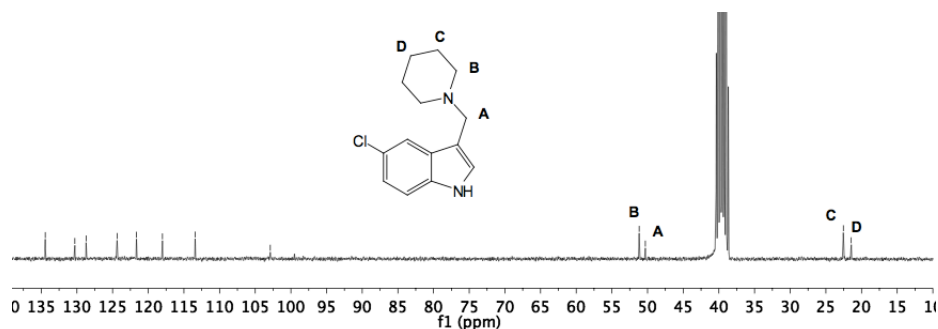


Figura 56. Asignación parcial de las señales de carbono correspondientes al derivado **32**.

Tras confirmar la estructura de los compuestos finales, aquellos que se obtuvieron como aceites, con el objetivo de facilitar su manipulación y evaluación biológica, se salinizaron a sales de clorhidrato u oxalato, mediante la adición gota a gota de 1 equiv de una solución de ácido clorhídrico o ácido oxálico (1 M) en éter dietílico o acetato de etilo, respectivamente. Si bien una vez salinizados los compuestos fueron estables, durante su preparación algunos se descompusieron, especialmente cuando se utilizó el procedimiento para la formación de los clorhidratos, obteniéndose estos con un rendimiento medio del 65 %, y los oxalatos con un 85 % ^[200] ^[197]. En RMN de ¹H, la formación de las sales produce un gran desapantallamiento, tanto de las señales de hidrógeno pertenecientes a C3CH₂N, como sobre las señales de dimetilamina y piperidina. Como se aprecia en la Figura 57, el espectro del oxalato del derivado **13** muestra un desplazamiento hacia campo bajo de la señal “A” (de 3,53 a 4,58 ppm) y de la señal “B” (de 2,18 a 2,70 ppm). En el caso de compuestos con piperidina, como por ejemplo el derivado **19**, además de desplazarse la señal “A” (de 3,58 a 4,35 ppm), las señales correspondientes a la piperidina aparecen desapantalladas y desdobladas. Así, H2’ cambia de ser un multiplete entre 2,33-2,36 ppm a dos multipletes en 3,58 y 4,35 ppm, cada uno integrando para dos protones. Lo mismo ocurre con H3’ (de 1,53 a 1,80 ppm) y H4’ (de 1,40 a 1,50 ppm) (Figura 58).

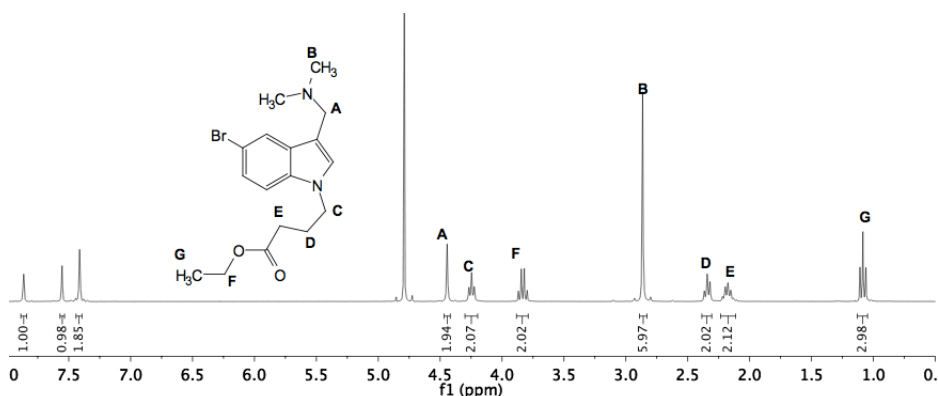


Figura 57. Asignación de las señales de protón correspondientes al oxalato del derivado **13**.

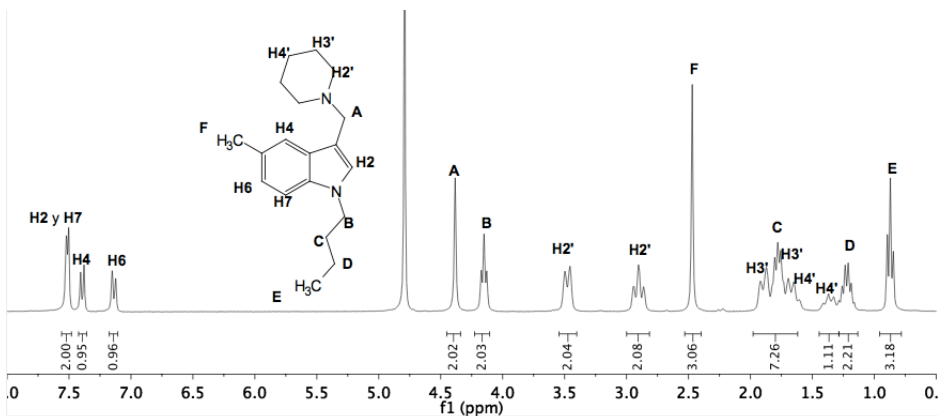


Figura 58. Asignación de las señales de protón correspondientes al clorhidrato del derivado **19**.

El caso de los derivados sustituidos con dos piperidinas (**11**, **12**, **23** y **24**), así como los *Derivados Piridínicos*, merecen especial mención, ya que ambos poseen dos nitrógenos potencialmente salinizables. En el primer caso, efectivamente, para la formación de sus respectivas sales se emplearon dos equivalentes de ácido oxálico, confirmandose la doble ionización mediante RMN de ^{13}C (dos señales a 167 y 165 ppm) y mediante el análisis químico elemental, que se ajusta con dos moléculas de oxalato. Sin embargo, la piridina de los derivados con estructura de 1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridina no puede ser salinizada, por lo que esos derivados solo muestran una señal a 163-164 ppm en el espectro de RMN de ^{13}C y su microanálisis se ajusta con una molécula de oxalato.

Por último, se estudió la estabilidad química de los compuestos salinizados a pH fisiológico, mediante monitorización de los espectros de RMN de ^1H y de ^{13}C en D_2O y en $\text{DMSO-}d_6$, no detectándose ninguna modificación en sus señales tras 10 días.

Para ratificar la obtención de los productos deseados, se hizo un estudio mediante cristalografía de rayos X de dos compuestos representativos, el derivado **2** (base libre, $\text{R} = \text{H}$, $\text{R}' = \text{CH}_3$) y el derivado **14** (sal de oxalato, $\text{R} = -(\text{CH}_3)_2\text{CO}_2\text{Et}$, $\text{R}' = -(\text{CH}_2)_5-$). En la Figura 59 se representan las estructuras resueltas mediante dicha técnica, que corroboran la obtención del 1-(5-bromo-1*H*-indol-3-il)-*N,N*-dimetilmetanamina (derivado **2**) y del 4-(5-bromo-3-(piperidin-1-ilmetil)-1*H*-indol-1-il)butanoato de etilo (derivado **14**), encontrándose este último junto con el oxalato monoprotonado y con su nitrógeno piridínico protonado, de forma que las cargas encajan.

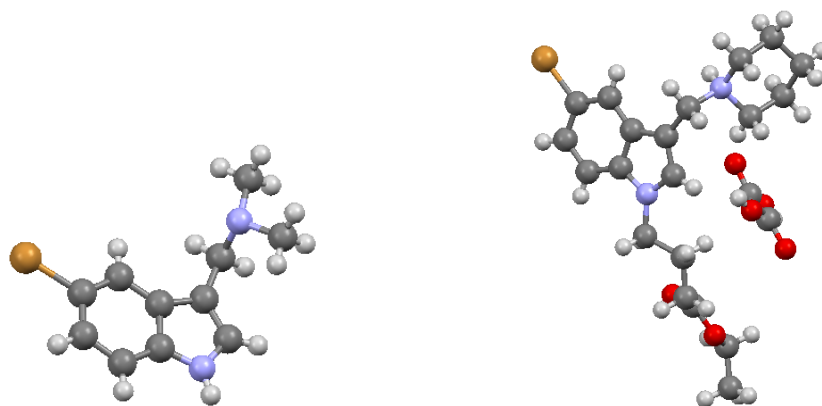


Figura 59. Estructuras resueltas mediante cristalografía de rayos X de los derivados **2** (izquierda) y **14** (derecha).

La primera familia de derivados de gramina sintetizada fueron los *Derivados Bromados*, y por este motivo es la más completa. Presenta todos los sustituyentes intermedios introducidos por *N*-alquilación (Bn, Bu, propargilo, Cl-butilo, piperidinil y butirato de etilo) y todas las posibles combinaciones de estos con dimetilamina y piperidina, a excepción del compuesto con Cl-butilo

y dimetilamina. Este derivado no pudo ser sintetizado porque la reacción de Mannich dio lugar a una compleja mezcla entre el producto deseado y un producto con dos restos de dimetilamina, tanto sobre el C3 como sobre el Cl-butilo. Este mismo problema ocurría con los *Derivados Metilados*, por lo que se descartó la síntesis de dicho compuesto.

Como se ha mencionado previamente, dado que no se pudo mejorar el rendimiento para la obtención del producto intermedio con butanoato de etilo, no se sintetizaron derivados con dicho sustituyente en ninguna de las demás familias.

Si bien la siguiente familia sintetizada fueron los *Derivados Metilados* y por ello también presenta un gran número de compuestos, los derivados sustituidos con Cl-butilo y piperidinil fueron descartados para el resto de familias puesto que dichos sustituyentes ofrecían propiedades farmacológicas de menor interés.

Las mayores dificultades se presentaron al tratar de introducir la base de Mannich sobre el C3 de productos con el nitrógeno indólico no sustituido. Únicamente los derivados **2**, **3** y **32** se pudieron obtener mediante el *Procedimiento general V*, con un 80 % rendimiento. Para los derivados **16** y **25** se recurrió a la utilización de la ruta alternativa vía *N*-óxidos descrita en el *Procedimiento general IV*, gracias a que, en ambos casos, los correspondientes derivados con dimetilamina se encontraban disponibles comercialmente. Sin embargo, derivados con estructura de 1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridina y el nitrógeno indólico libre no pudieron ser sustituidos sobre el C3 mediante la reacción de Mannich, puesto que las aminas secundarias se introducían tanto en el *N*₁ como en el *N*₇, observándose en los espectros de RMN la pérdida de la señal NH y la aparición de las señales correspondientes a la dimetilamina o piperidina, siendo lo más relevante que la señal perteneciente al H3 seguía inalterada.

La reacción de Mannich es una poderosa herramienta para la formación de enlaces carbono-carbono, y por ello es ampliamente utilizada para la preparación de aminoalquil derivados. De hecho, para la síntesis de 3-aminometilindoles es de particular interés dada la potencial actividad biológica de estos compuestos, similares a las aminas biogénicas, y como paso intermedio para la síntesis de alcaloides ergóticos ^[281] ^[282] ^[232]. Para esta Memoria de Tesis se empleó el protocolo publicado por Miranda y col., (2007) pero modificando el orden de adición de los reactivos, lo cual supuso una mejora de los rendimientos hasta niveles cuantitativos. El protocolo descrito comienza con la disolución del indol en AcOH a 0 °C y sobre él añadir primero la amina secundaria y, posteriormente, el formaldehído. En nuestro caso, la formación previa del ión iminio para su adición lenta sobre el indol optimiza el protocolo, como ilustra el caso del derivado **4**, cuyo rendimiento asciende de un 38 %, con el protocolo previamente descrito, a > 99 %, con el nuevo orden de adición. A pesar de que existen numerosas publicaciones que describen la preparación de bases de Mannich análogas a gramina, muchos de los métodos propuestos presentan inconvenientes, como largos tiempos de reacción, altas

temperaturas o bajos rendimientos^{[232] [282]}. Dai y col.^[283] mejoran el procedimiento mediante el empleo de ZnCl_2 como catalizador, manteniendo los rendimientos cuantitativos pero disminuyendo los tiempo de reacción a 90 min. También Li y col.^[284] proponen la modificación del protocolo clásico, manteniendo el medio acuoso ácido, el formaldehído y las aminas secundarias, pero llevando a cabo la reacción a 35 °C y bajo radiaciones ultrasónicas, lo cual consigue evitar la adición de los reactivos a 0 °C y acortar el tiempo de reacción a 30 min, manteniendo rendimientos cuantitativos.

3.7. Discusión general

Es importante resaltar que, en contraposición a toda la literatura publicada sobre la síntesis y la aplicación de los 3-aminoetilindoles, respaldada por la química del triptófano, la serotonina y la melatonina, entre otras aminas biogénicas^{[285] [286]}, el estudio de los derivados de 3-aminometilindol ha sido casi inapreciable. De hecho, el interés en los derivados de gramina ha ido principalmente encaminado a su utilización como productos de partida en síntesis de análogos de productos naturales, como por ejemplo los derivados ergóticos o la serotonina^[232, 287]. El principal motivo para esta falta de interés es su delicada estabilidad química en medios acuosos ácidos, ya que, como se ha mencionado anteriormente^{[280] [288] [260]}, con relativa facilidad descomponen en 3-metilen-3*H*-indoles. No obstante, a lo largo del desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral se han ido identificando los factores que favorecían la inestabilidad de los productos, tomando las medidas necesarias para prevenirla, como por ejemplo la neutralización de los disolventes orgánicos con posibles trazas de ácido (principalmente CH_2Cl_2), evitar el empleo de sílica gel como fase estacionaria en cromatografía o la preparación de las muestras para RMN en acetona- d_6 . Finalmente, la monitorización de los espectros de RMN de ^1H y de ^{13}C en D_2O y en $\text{DMSO-}d_6$, prueba la estabilidad química de los compuestos salinizados a pH fisiológico.

Del total de los 45 derivados de gramina sintetizados, siete (**2**, **3**, **4**, **25**, **26**, **27** y **33**) se encuentran ya citados en la literatura científica, siendo el resto novedosos. La mayoría de los artículos citan a dichos derivados como intermedios de síntesis, sin atribuírseles ninguna propiedad biológica^{[202] [201] [289] [290] [291]}. Como se ha mencionado en el apartado *VIII. 1. 1.1.*, Ehrhart y col. (1961) publicaron un artículo titulado “*1-benzylgramine derivatives with serotonin antagonism*”, en el que describieron por primera vez a los derivados **4**, **26**, **27** y **33**, atribuyéndoles propiedades antiserotoninérgicas. Por esto, cabe la posibilidad de que los derivados de gramina ejerzan algún efecto sobre el sistema serotoninérgico, lo cual no ha sido explorado por quedar fuera del alcance de esta Memoria de Tesis. Olgen y col., (2011)

estudiaron la capacidad antioxidante de algunos derivados de gramina, entre los que se encuentran los derivados **3** y **25**. Ambos se evaluaron en un modelo de peroxidación lipídica *in vitro*, en el cual el derivado **25** ofreció un gran efecto antioxidante, al contrario que el derivado **3** que apenas mostró actividad ^[241]. Por otro lado, el derivado **25** también es descrito en un artículo de Kulagowski y col. (1996), donde, partiendo de la estructura de 3-(piperidin-1-ilmetil)-1*H*-indol, funcionalizan la piperidina y estudian la capacidad de los derivados de antagonizar el receptor de dopamina D₄, con potencial indicación para la esquizofrenia. Si bien el compuesto con la piperidina no sustituida (derivado **25**) carece de actividad sobre dicho receptor, moléculas sustituidas con grupos muy lipófilos en posición 4 de la piperidina muestran una gran afinidad por el receptor ^[292].

3.8. Conclusiones parciales

- Partiendo de precursores comerciales con el sustituyente deseado en posición C5, se sintetizaron un total de 44 derivados de gramina en dos o tres pasos de reacción, en condiciones suaves y con rendimientos altos en la mayoría de los casos.
- Los dos protocolos utilizados para la N₁-alquilación son regioselectivos y rinden los productos deseados en rendimientos altos, con la excepción del sustituyente butirato de etilo.
- La reacción de Mannich permite formación de los 3-aminometilindoles y 3-aminometil-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridinas, con buenos rendimientos.
- Los derivados con el nitrógeno indólico libre son los que más dificultades presentan para su preparación. Si bien los derivados **2**, **3**, y **32** se obtuvieron mediante la reacción de Mannich, para los derivados **16** y **25** se diseñó una ruta de síntesis alternativa, a través de la formación de sus respectivos *N*-óxidos y posterior intercambio dimetilamina/piperidina. *Derivados Piridínicos* no sustituidos sobre el nitrógeno pirrólico no se pudieron sintetizar.
- El principal inconveniente de la gramina y sus derivados es su baja estabilidad química en medios acuosos ácidos, que fácilmente derivan en 3-metilen-3*H*-indoles. Este problema se ha solventado mediante el tratamiento de los crudos de reacción a pH 14, la neutralización de los disolventes orgánicos utilizados, el empleo de alúmina básica tanto en las placas de TLC como en las fases estacionarias de las cromatografías en columna, la preparación de los espectros de RMN en acetona-*d*₆ y la salinización de los compuestos.

4. PREDICCIÓN DEL PASO DE BARRERA HEMATOENCEFÁLICA BASADO EN PROPIEDADES MOLECULARES

4.1. Justificación

Puesto que los derivados de gramina descritos en esta Memoria de Tesis tienen como objetivo ejercer su efecto en el sistema nervioso, es ineludible plantear la cuestión de si son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE). En la I+D de fármacos, la mayor tasa de fracaso en ensayos clínicos corresponde a fármacos dirigidos al sistema nervioso central, siendo un reducido paso a través de la BHE una de las principales causas ^[293]. No obstante, su estudio se minusvalora, siendo especialmente notorio en la I+D de fármacos para la EA, donde moléculas particularmente grandes, como péptidos o anticuerpos, han entrado en ensayos clínicos para fracasar por una escasa permeabilidad cerebral ^[293]. Implementar técnicas para la predicción del paso de la BHE en estadios muy tempranos de la I+D de medicamentos, incluso antes de ser sintetizados, ayudaría a descartar candidatos no válidos y disminuir las tasas de fracaso en los ensayos clínicos, suponiendo un importante ahorro económico ^[294] ^[293].

Para la estimación del paso de la BHE existen modelos *in vivo*, *in vitro* e *in silico*. El uso de modelos *in vivo*, generalmente roedores, para determinar la farmacocinética de un compuesto, es frecuente en la industria farmacéutica en fases avanzadas de estudios preclínicos. Los modelos *in vitro* abarcan desde complejos cultivos primarios de células de endotelio cerebral, que presentan mecanismos de expulsión y transportadores al igual que la BHE, o modelos celulares subrogados (generalmente de origen epitelial como las células intestinales Caco-2 o las células de origen renal MDCK), hasta métodos más simples no basados en células, como columnas de HPLC o membranas artificiales (como por ejemplo el método PAMPA), que mimetizan propiedades de membranas biológicas ^[294] ^[293]. A partir de datos obtenidos en modelos *in vivo* e *in vitro* se han construido los modelos de predicción *in silico*, con el objetivo de cribar un gran número de fármacos sin implicar preparaciones biológicas ^[295]. Estos modelos ofrecen unas simples guías relativas a las propiedades moleculares que debe presentar un compuesto para favorecer su permeabilidad cerebral. Dichas propiedades pueden ser calculadas experimentalmente o mediante programas informáticos ^[295] ^[294].

Según Abbott y col. (2008), los métodos *in silico* para la predicción del paso a través de la BHE son suficientes durante la fase inicial de identificación del compuesto *hit* y búsqueda de un cabeza de serie, para proporcionar a estos un potencial perfil farmacocinético correcto. En fases más avanzadas de la I+D del medicamento, como por ejemplo en la optimización del compuesto cabeza de serie, se utilizarían los métodos *in vitro* e *in vivo*. Así, para el estudio del paso a

través de la BHE de los compuestos objeto de esta Memoria de Tesis, se propone la predicción *in silico* basada en las propiedades moleculares de los compuestos.

4.2. Aplicación del estudio de las propiedades moleculares en el diseño de fármacos

La mayoría de moléculas que llegan a convertirse en fármacos y son comercializados poseen una serie de propiedades físico-químicas que caen dentro de un rango de valores limitado y conocido como el espacio *drug-like*. Así, surge el concepto de *drug-likeness*, que intenta predecir las posibilidades que tiene una nueva molécula de alcanzar la clínica, en base a la similitud entre las propiedades físicoquímicas de la molécula y los fármacos comercializados. El 96 % de las moléculas que entran en estudios clínicos fracasan, muchos de los casos debidos a propiedades físico-químicas desfavorables. Sin embargo, la selección de moléculas en base a su *drug-likeness*, es decir, sus propiedades físicoquímicas, durante las etapas más tempranas del diseño y síntesis de medicamentos aumenta las probabilidades de éxito a la hora de ser evaluadas en ensayos clínicos ^[296]. Con estas propiedades, podemos estimar procesos como la biodisponibilidad oral ^[297], el *drug-likeness* ^[296] o el paso a través de la BHE ^[295].

El primero en definir estas propiedades moleculares fue el químico médico Christopher Lipinski en el año 2001, con la conocida “regla de los 5” o “regla de Lipinski” para predecir la absorción oral de fármacos. Lipinski y col. analizaron las propiedades físicoquímicas de más de 2000 fármacos (comercializados o en fases avanzadas de ensayos clínicos) y concluyeron que las probabilidades de permear las membranas celulares y ser absorbido vía oral son mayores si los compuestos cumplen con los siguientes criterios:

1. Peso molecular < 500 g/mol
2. Lipofilia o ClogP < 5
3. N° grupos donadores de enlaces de hidrógeno (OH + NH) < 5
4. N° grupos aceptores de enlaces de hidrógeno (O+N) < 10

Si una molécula incumple dos o más de estos criterios, su absorción oral está muy dificultada. El 90 % de los fármacos (excluyendo grupos terapéuticos como antibióticos, antifúngicos, vitaminas y glicósidos cardíacos, los cuales no atraviesan las membranas por difusión pasiva sino que requieren de transportadores específicos dadas sus características estructurales) que analizaron estaban dentro de estos criterios.

Posteriormente, con el objetivo de cuantificar el *drug-likeness* de las moléculas, Hopkins y col. analizaron las propiedades físicoquímicas de 771 fármacos comercializados. Partiendo de la

regla de Lipinski, los autores ampliaron a 8 los parámetros moleculares determinantes, incluyendo el número de anillos aromáticos ($< 3,5$), número de enlaces con capacidad de rotación en la molécula (< 12), el área de superficie polar (PSA, < 150) y el número de grupos conocidos con potencial toxicidad (< 3)^[296].

4.3. *Propiedades fisicoquímicas determinantes para el paso de la barrera hematoencefálica*

La lipofilia y la solubilidad acuosa son los factores más determinantes que influyen en el paso de la BHE. La lipofilia, directamente relacionada con la permeabilidad a través de bicapas lipídicas, se puede expresar como **log P**, siendo **P** el coeficiente de partición, que es el cociente entre las concentraciones de una sustancia en cada una de las fases de una mezcla de dos disolventes inmiscibles en equilibrio. Para este cálculo, se suele usar una mezcla de *n*-octanol y agua. Cuando el valor del log P es calculado por métodos predictivos y no experimentales se expresa como log P calculado (ClogP). Indica el carácter hidrófilo o hidrófobo de una sustancia, de manera que a mayor log P mayor hidrofobicidad, y por tanto mejor paso a través de bicapas lipídicas, y a menor log P mayor hidrofilia, y por tanto mejor solubilidad acuosa. No obstante, el 80 % de los fármacos son ionizables y el valor de log P es independiente del pH. Es el **log D**, siendo **D** el coeficiente de distribución, quien cuantifica el cociente entre la suma de las concentraciones de todas las formas del compuesto (ionizadas y no-ionizadas) en cada una de las dos fases.

El número de grupos **donadores** de enlaces de hidrógeno (suma de NH y OH) y de grupos **aceptores** de enlaces de hidrógeno (suma de átomos de N y O) da una estimación simple de la solubilidad acuosa del fármaco. A mayor número de estos grupos en la molécula, peor permeabilidad a través de bicapas lipídicas, pero mejor solubilidad acuosa. El **área de superficie polar** (PSA) mide la polaridad de una molécula y refleja su hidrofilia, de manera que cuanto mayor es el PSA, más dificultado está el paso de la BHE pero mejor solubilidad acuosa. El **peso molecular** (PM) es otro de los factores limitantes en el paso de la BHE, dado que conforme aumenta el PM, también aumenta la dificultad para atravesarla.

Como se ha mencionado previamente, la mayoría de fármacos son ácidos o bases débiles, que se pueden encontrar en forma ionizada y no ionizada. La fracción ionizada es hidrosoluble y, si el tamaño del ión grande, difunde muy poco. La fracción no ionizada es, por el contrario, liposoluble, y es la única que difunde bien a través de la membrana celular. El grado de ionización de una sustancia se define como **pK_a** y es clave para la permeabilidad de las membranas. Moléculas con un valor de pK_a por debajo de 4 o por encima de 10 están

completamente ionizadas a pH fisiológico, por lo que no existe fracción no ionizada que pueda atravesar la membrana.

Numerosos estudios tratan de inferir el rango de valores adecuado para el paso de la BHE de cada una de estas propiedades moleculares. Si se comparan fármacos que atraviesan la BHE con los que no la atraviesan, se puede extrapolar que los compuestos dirigidos al sistema nervioso central tienden a ser más lipófilos, más rígidos, con menor número de donadores de enlaces de hidrógeno, menor número de grupos cargados (especialmente cargas negativas) y menor PSA^[294]. Según Wager y col., los parámetros óptimos que debería tener un fármaco dirigido al sistema nervioso central son^[298]:

ClogP = 2,8	PM = 305,3 g/mol	NH+OH = 1
ClogD = 1,7	PSA = 44,8 Å ²	pK _a = 8,4

Tras una revisión bibliográfica exhaustiva, se han establecido los siguientes valores óptimos para la estimación del paso de BHE de los derivados de gramina descritos en esta Memoria de Tesis^{[299] [300] [301] [302] [303]}.

PM [160-450]	N + O ≤ 5	ClogP < 5	PSA ≤ 90
	NH + OH < 3	ClogD pH= 7,4 [0,4]	pK_a [4,10]

4.4. Resultados y discusión sobre el estudio del paso de barrera hematoencefálica de la gramina y sus derivados

El cálculo de estas propiedades moleculares se ha llevado a cabo con aplicaciones de predicción computacional, según se describe en la parte experimental. A continuación se presentan los valores obtenidos para cada uno de los derivados de gramina, agrupados según el sustituyente en el anillo bencénico:

Derivados	PM	N + O	NH + OH	ClogP	ClogD pH = 7,4	PSA	pK_a
Bromados	[160-450]	≤ 5	< 3	< 5	[0,4]	≤ 90	[4,10]
2	253,13	1	1	2,78	0,98	19,03	9,20
3	293,20	1	1	3,63	2,95	19,03	7,98
4	343,26	2	0	4,73	2,95	8,17	9,18
5	383,32	2	0	5,58	4,86	8,17	8,03

6	309,24	2	0	4,33	2,55	8,17	9,18
7	349,31	2	0	5,18	4,47	8,17	8,02
8	291,19	2	0	3,23	1,46	8,17	8,85
9	331,25	2	0	4,08	3,38	8,17	8,01
10	383,75	2	0	5,10	4,39	8,17	8,02
11	392,38	3	0	4,45	-0,75	11,41	8,78; 9,65
12	432,44	3	0	5,30	1,11	11,41	7,22; 9,58
13	367,28	4	0	3,51	1,73	34,47	9,18
14	407,34	4	0	4,36	3,65	34,47	8,02

Derivados	PM	N + O	NH + OH	ClogP	ClogD pH = 7,4	PSA	pK_a
Metilados	[160-450]	≤ 5	< 3	< 5	[0,4]	≤ 90	[4,10]
15	188,27	1	1	2,53	0,62	8,98	9,03
16	228,33	1	1	3,38	1,25	19,03	9,20
17	278,39	2	0	4,47	2,60	8,17	8,96
18	318,46	2	0	5,33	3,31	8,17	9,09
19	284,44	2	0	4,92	2,92	8,17	9,18
20	226,32	2	0	2,98	1,11	8,17	8,95
21	266,38	2	0	3,83	1,84	8,17	9,07
22	318,88	2	0	4,84	2,84	8,17	9,08
23	327,51	3	0	4,20	-1,09	11,41	8,86; 9,27
24	367,57	3	0	5,05	-0,33	11,41	8,96; 9,69

Derivados	PM	N + O	NH + OH	ClogP	ClogD pH = 7,4	PSA	pK_a
No sustituidos	[160-450]	≤ 5	< 3	< 5	[0,4]	≤ 90	[4,10]
Gramina (1)	264,27	1	1	2,01	0,15	19,03	9,27
25	214,31	1	1	2,86	0,65	19,03	9,29
26	264,36	2	0	3,96	2,12	8,17	8,92
27	304,43	2	0	4,81	2,73	8,17	9,16
28	230,35	2	0	3,56	1,78	8,17	8,92
29	270,41	2	0	4,41	2,34	8,17	9,14
30	212,29	2	0	2,47	0,63	8,17	8,91
31	252,35	2	0	3,32	1,26	8,17	9,13

Derivados	PM	N + O	NH + OH	ClogP	ClogD pH = 7,4	PSA	pK_a
Clorados	[160-450]	≤ 5	< 3	< 5	[0,4]	≤ 90	[4,10]
32	248,75	1	1	3,47	2,26	19,03	8,29
33	298,81	2	0	4,57	2,81	8,17	8,84
34	338,87	2	0	5,42	4,22	8,17	8,27

35	264,79	2	0	4,17	2,40	8,17	8,84
36	304,86	2	0	4,99	3,83	8,17	8,25
37	246,74	2	0	3,07	1,32	8,17	8,83
38	286,80	2	0	3,92	2,75	8,17	8,24

Derivados	PM	N + O	NH + OH	ClogP	ClogD pH = 7,4	PSA	pK _a
Piridínicos	[160-450]	≤ 5	< 3	< 5	[0,4]	≤ 90	[4,10]
39	344,25	3	0	3,88	2,13	21,06	8,83; 0,97
40	384,31	3	0	4,73	4,11	21,06	7,63; 0,94
41	310,23	3	0	3,48	1,72	21,06	8,83; 1,01
42	350,30	3	0	4,33	3,72	21,06	7,62; 0,98
43	292,17	3	0	2,38	0,64	21,06	8,82; 0,90
44	332,24	3	0	3,23	2,63	21,06	7,61; 0,87
45	295,38	4	0	2,95	1,22	30,29	8,81; 2,03
46	335,44	4	0	3,80	2,26	30,29	8,62; 1,93

Tabla 4. Propiedades moleculares de la gramina y sus derivados. Debajo de cada propiedad molecular se indica el rango óptimo de valores. En rojo se presentan los valores que quedan fuera de los intervalos adecuados.

Según los valores obtenidos, la gramina y la mayoría de sus derivados poseen las propiedades moleculares adecuadas para poder atravesar la BHE por mecanismos de difusión pasiva.

En todos los casos, los valores fuera de los rangos considerados adecuados son los relativos al ClogP y logD. Son los sustituyentes en el nitrógeno pirrólico de mayor tamaño o hidrofobicidad [benceno, 4-(piperidin-1-il)butilo, *n*-butilo o Cl-butilo] los que provocan los mayores incrementos en los valores de ClogP y logD. De la misma manera, los compuestos que presentan piperidina en C3 tienen un valor de ClogP mayor que aquellos con dimetilamina. En relación a C5, la introducción de un sustituyente (Br, Cl, CH₃) incrementa la lipofilia, en comparación con las familias de los derivados no sustituidos o piridínicos, que presentan valores de ClogP y logD similares. Así, los derivados de gramina **5**, **18**, **34** y **40** (con bencilo en N₁, piperidina en posición C3 y sustituido en C5) y todos aquellos con 4-(piperidin-1-il)butilo en N₁ (**11**, **12**, **23**, **24**) exceden los valores de ClogP y logD adecuados. No obstante, no podemos afirmar que estos compuestos no sean capaces de atravesar la BHE, sino que simplemente no poseen las propiedades moleculares óptimas. Sería necesario estudiar su permeabilidad cerebral por otros métodos *in vitro*, puesto que en ciertos casos algunas propiedades fisicoquímicas son capaces de compensar valores inadecuados de otras.

El PSA es uno de los parámetros fisicoquímicos que más se ha visto modificado en función de cada sustituyente introducido. Partiendo de un valor de PSA de 19,03 para gramina y derivados con N_1 no sustituido (**2**, **3**, **16**, **25** y **32**), este valor disminuye a 8,17 al introducir un sustituyente que carezca de nuevos donadores o aceptores de hidrógeno. Sin embargo, aumenta a 11,41 en el caso de derivados con 4-(piperidin-1-il)butilo (**11**, **12**, **23** y **24**, con un nitrógeno más) y a 34,47 en derivados con butirato de etilo (**13** y **14**, con dos oxígenos más). Los derivados piridínicos (**39-44**) presentan un PSA de 21,06 gracias al nitrógeno adicional, el cual se incrementa a 30,29 al introducir el grupo metoxi (**45** y **46**). En otras palabras, los derivados piridínicos son los que presentan mejor solubilidad acuosa y los derivados de gramina con sustituciones en N_1 los menos solubles.

Los valores de pK_a indican que todos los compuestos se encuentran mayoritariamente ionizados a pH fisiológico. Tanto por métodos computacionales como por RMN de 1H en agua deuterada, lo que será explicado posteriormente, pensamos que la ionización se debe a la protonación en el nitrógeno unido a C3, ya sea dimetilamina o piperidina, estando doblemente protonados en el caso de los derivados con 4-(piperidin-1-il)butilo. Ni el nitrógeno pirrólico ni el piridínico se encuentran protonados en condiciones fisiológicas. Conforme aumenta el valor de pK_a , o relación entre la forma ionizada y no ionizada, mayor es la fracción ionizada de las moléculas. Los valores de pK_a encontrados son muy próximos al límite superior permitido, pero suficiente para que siempre exista una fracción neutra capaz de atravesar la BHE por difusión pasiva. Por ejemplo, los derivados **4** ($pK_a = 9,18$) y **5** ($pK_a = 8,03$), a pH 7,4, se encuentran protonados en un 98 % y un 80 %, respectivamente, por lo que la fracción neutra es de un 2 y un 20 %. Por otro lado, compuestos con aminas terciarias (una característica muy frecuente en fármacos del sistema nervioso central, como por ejemplo la memantina) muestran una mayor permeabilidad cerebral real que la esperada para sus valores de pK_a ^[294].

Brevemente, la mayoría de derivados cumplen la regla de los 5 de Lipinski, por lo que serían adecuados para una absorción vía oral. También los criterios de Hopkins y col. son alcanzados, presentando las moléculas un aceptable *drug-likeness* o similitud con las propiedades fisicoquímicas de fármacos comercializados.

El principal inconveniente de estos métodos *in silico* es que se limitan a estimar el paso a través de la BHE por mecanismos de difusión pasiva, siendo imposible predecir el papel de mecanismos de transporte activo o de sistemas de expulsión de fármacos, como por ejemplo el mediado por la glicoproteína P ^[294]. La glicoproteína P es una proteína de membrana presente en la BHE que actúa como bomba expulsora de sustancias xenobióticas, dependiente de ATP y con amplia especificidad de sustrato, siendo una de las principales causas de la baja permeabilidad

cerebral ^[294]. Aunque es muy difícil de predecir, algunos autores defienden que valores de PSA < 60, pKa < 8 y NH+OH < 2 minimizan el riesgo de ser reconocidos por dicha proteína ^[304]. En el caso de los derivados de gramina, en su mayoría presentan valores de pKa mayores de 8, por lo que, aunque sí que cumplen los otros dos criterios, no se pueden sacar conclusiones en este aspecto. De cualquier forma, para fases más avanzadas del desarrollo de estos derivados de gramina sería imprescindible profundizar en el estudio del paso de BHE mediante métodos *in vitro* o *in vivo*.

4.5. Conclusiones parciales

- La gramina y la mayoría de sus derivados poseen las propiedades moleculares adecuadas para facilitar su permeabilidad cerebral por mecanismos de difusión pasiva.
- La alta lipofilia de algunos de los compuestos es el principal factor limitante para el paso de BHE.
- Aquellos compuestos con sustituyentes más voluminosos e hidrófobos en la posición N_1 del indol presentarían un paso de barrera hematoencefálica más dificultado.
- La gramina, sus derivados no sustituidos en C5 y los derivados piridínicos son los que presentan las mejores propiedades moleculares para favorecer el paso de BHE.

5. ESTUDIO FARMACOLÓGICO DEL MECANISMO DE ACCIÓN

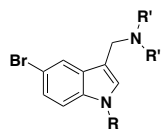
Tanto la gramina como los nuevos compuestos sintetizados se evaluaron farmacológicamente para determinar el efecto que producen sobre los incrementos de la $[Ca^{2+}]_c$ ($\Delta[Ca^{2+}]_c$) y sobre la actividad enzimática de las Ser/Thr fosfatasas. A continuación se presentan los resultados obtenidos, así como la discusión de los mismos.

5.1. *Efecto sobre los incrementos de Ca^{2+} inducidos por despolarización*

En primer lugar, se estudió el efecto de todos los compuestos sobre los incrementos de Ca^{2+} inducidos por despolarización, mediante el uso de la sonda Fluo-4, sometiendo a las células SH-SY5Y a altas concentraciones extracelulares de K^+ (70 mM). Con los resultados obtenidos en estos experimentos, se seleccionaron un total de 8 compuestos, en función del bloqueo ejercido en los experimentos de fluorescencia o de su estructura, para investigar su efecto directo sobre los CCDV, midiendo mediante técnicas de *patch-clamp* la modulación de las corrientes de Ca^{2+} (I_{Ca}) evocadas en células cromafines bovinas. Además, con el compuesto que mostró mejor capacidad bloqueadora, se llevaron a cabo experimentos para determinar los subtipos de CCDV involucrados en el bloqueo. Los experimentos de *patch-clamp* se realizaron en el laboratorio del Prof. Luis Gandía, del departamento de Farmacología y Terapéutica de la Universidad Autónoma de Madrid.

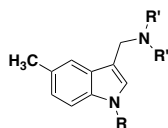
Efecto sobre la entrada de Ca^{2+} inducida por despolarización en células SH-SY5Y

Las células SH-SY5Y se estimularon con una solución extracelular de KCl 70 mM, lo cual induce la despolarización de la membrana plasmática y un $\Delta[Ca^{2+}]_c$, fundamentalmente mediado por la apertura de los CCDV ^[305]. Dichas células constituyen un buen modelo para la monitorización de oscilaciones en la $[Ca^{2+}]_c$, pues presentan CCDV y organelas intracelulares similares a los que existen en los cultivos primarios neuronales ^[306]. Así, las células SH-SY5Y, cargadas con la sonda sensible al Ca^{2+} Fluo-4/AM, experimentaron un incremento en su $[Ca^{2+}]_c$ cuando se aplicó al cultivo la solución despolarizante, siendo este incremento modulado por la presencia de la gramina y sus derivados, preincubados a la concentración de 1 μ M. Como se puede observar en la Tabla 5, 20 de los 46 compuestos evaluados redujeron el $\Delta[Ca^{2+}]_c$ de manera estadísticamente significativa. El antagonista de CCDV nifedipino ^[131], utilizado como control a la concentración de 3 μ M, disminuyó las elevaciones de Ca^{2+} en un 57 %. Por su parte, la gramina ejerció un bloqueo modesto (25 %), siendo el compuesto bromado **7** ($R = n\text{-Bu}$, $R' = \text{piperidina}$) su mejor derivado con un 63 % de bloqueo.



Derivados Bromados	R	R'	% Bloqueo
Nifedipino	-	-	57 ± 4 ^{***}
2	H	CH ₃	3 ± 3 ^{n.s.}
3	H	-(CH ₂) ₅ -	7 ± 7 ^{n.s.}
4	Bn	CH ₃	38 ± 6 ^{***}
5	Bn	-(CH ₂) ₅ -	45 ± 3 ^{***}
6	<i>n</i> -Bu	CH ₃	14 ± 6 ^{n.s.}
7	<i>n</i> -Bu	-(CH ₂) ₅ -	63 ± 4 ^{***}
8	CH ₂ C≡CH	CH ₃	10 ± 5 ^{n.s.}
9	CH ₂ C≡CH	-(CH ₂) ₅ -	42 ± 3 ^{***}
10	-(CH ₂) ₄ Cl	-(CH ₂) ₅ -	57 ± 6 ^{***}
11	-(CH ₂) ₄ Pi	CH ₃	14 ± 6 ^{n.s.}
12	-(CH ₂) ₄ Pi	-(CH ₂) ₅ -	19 ± 7 [*]
13	-(CH ₂) ₃ CO ₂ Et	CH ₃	13 ± 6 ^{n.s.}
14	-(CH ₂) ₃ CO ₂ Et	-(CH ₂) ₅ -	16 ± 3 ^{n.s.}

*Pi= piperidinil

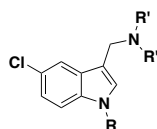


Derivados Metilados	R	R'	% Bloqueo
Nifedipino	-	-	57 ± 4 ^{***}
15	H	CH ₃	10 ± 5 ^{n.s.}
16	H	-(CH ₂) ₅ -	16 ± 6 ^{n.s.}
17	Bn	CH ₃	18 ± 6 ^{n.s.}
18	Bn	-(CH ₂) ₅ -	22 ± 9 [*]
19	<i>n</i> -Bu	-(CH ₂) ₅ -	21 ± 6 [*]
20	CH ₂ C≡CH	CH ₃	14 ± 6 ^{n.s.}
21	CH ₂ C≡CH	-(CH ₂) ₅ -	25 ± 7 ^{**}
22	-(CH ₂) ₄ Cl	-(CH ₂) ₅ -	35 ± 5 ^{***}
23	-(CH ₂) ₄ Pi	CH ₃	16 ± 7 ^{n.s.}
24	-(CH ₂) ₄ Pi	-(CH ₂) ₅ -	4 ± 3 ^{n.s.}

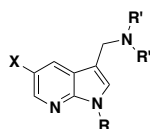
*Pi= piperidinil



<i>Derivados no sustituidos</i>	R	R'	% Bloqueo
Nifedipino	-	-	57 ± 4 ^{***}
Gramina (1)	H	CH ₃	25 ± 7 ^{**}
25	H	-(CH ₂) ₅ -	30 ± 4 ^{**}
26	Bn	CH ₃	22 ± 6 [*]
27	Bn	-(CH ₂) ₅ -	11 ± 7 ^{n.s.}
28	<i>n</i> -Bu	CH ₃	7 ± 6 ^{n.s.}
29	<i>n</i> -Bu	-(CH ₂) ₅ -	14 ± 8 ^{n.s.}
30	CH ₂ C≡CH	CH ₃	3 ± 3 ^{n.s.}
31	CH ₂ C≡CH	-(CH ₂) ₅ -	35 ± 5 ^{**}



<i>Derivados Clorados</i>	R	R'	% Bloqueo
Nifedipino	-	-	57 ± 4 ^{***}
32	H	-(CH ₂) ₅ -	8 ± 3 ^{n.s.}
33	Bn	CH ₃	40 ± 6 ^{***}
34	Bn	-(CH ₂) ₅ -	37 ± 7 ^{***}
35	<i>n</i> -Bu	CH ₃	23 ± 7 [*]
36	<i>n</i> -Bu	-(CH ₂) ₅ -	24 ± 8 [*]
37	CH ₂ C≡CH	CH ₃	18 ± 11 ^{n.s.}
38	CH ₂ C≡CH	-(CH ₂) ₅ -	33 ± 8 ^{**}



<i>Derivados Piridínicos</i>	X	R	R'	% Bloqueo
Nifedipino	-	-	-	57 ± 4 ^{***}
39	Br	Bn	CH ₃	46 ± 6 ^{***}
40	Br	Bn	-(CH ₂) ₅ -	15 ± 6 ^{n.s.}
41	Br	<i>n</i> -Bu	CH ₃	11 ± 6 ^{n.s.}

42	Br	<i>n</i> -Bu	-(CH ₂) ₅ -	9 ± 4 ^{n.s.}
43	Br	CH ₂ C≡CH	CH ₃	11 ± 6 ^{n.s.}
44	Br	CH ₂ C≡CH	-(CH ₂) ₅ -	8 ± 6 ^{n.s.}
45	CH ₃ O	Bn	CH ₃	10 ± 6 ^{n.s.}
46	CH ₃ O	Bn	-(CH ₂) ₅ -	19 ± 8 ^{n.s.}

Tabla 5. Porcentaje de bloqueo del incremento del Ca²⁺ citosólico, inducido por K⁺ 70 mM y medido con la sonda Fluo-4, ejercido por la gramina y sus derivados, en células SH-SY5Y. Los datos se expresan como la media ± error estándar de al menos 5 experimentos, normalizados frente al incremento en la entrada de Ca²⁺ observada en ausencia de los compuestos. Los compuestos se evaluaron a la concentración de 1 µM y el nifedipino a 3 µM. ****p* < 0,001, ***p* < 0,01, **p* < 0,05 y n.s. = no significativo.

Considerando los resultados obtenidos en la Tabla 5, ciertas relaciones entre la estructura química de los compuestos y su actividad pueden ser inferidas. La mayoría de los derivados capaces de bloquear el incremento de Ca²⁺ portan como sustituyente en el C3 indólico el grupo piperidinilmetil. En la mayoría de los compuestos se puede apreciar cómo, a igualdad en el resto de sustituyentes, la presencia de piperidina hace aumentar significativamente el bloqueo. Por ejemplo, los derivados bromados **6** y **7** (R= Bu) pasan de un 14 a un 63 % de bloqueo al cambiar el resto dimetilamina presente en **6**, por la piperidina presente en **7**, mientras que en los derivados no sustituidos **30** y **31** (R= CH₂C≡CH), con dimetilamina y piperidina, respectivamente, el bloqueo pasa de un 3 a un 35 %. Los compuestos **4**, **26**, **33**, **35** y **39**, junto con la gramina, fueron los únicos derivados con dimetilamina capaces de reducir el aumento de Ca²⁺.

En cuanto a la sustitución sobre el nitrógeno indólico, el motivo bencilo es el que ofrece el mayor bloqueo, aunque también el butilo, el Cl-butilo y el propargilo son sustituyentes apropiados para modular los incrementos de Ca²⁺, cuyos resultados mejoran cuando los compuestos presentan Br en C5 y piperidina en C3. Los compuestos con sustituyentes voluminosos sobre el nitrógeno indólico sufren una significativa pérdida de actividad, con valores por debajo del 20 % (**11**, **12**, **13**, **14**, **23** y **24**). A excepción de la gramina y su homólogo con piperidina (**25**), ninguno de los derivados con el nitrógeno indólico sin sustituir (**2**, **3**, **15**, **16** y **32**) fue capaz de bloquear de manera significativa el Δ[Ca²⁺]_c.

Análogamente a lo observado en la literatura, la familia de *Derivados Bromados* mostró el mejor bloqueo, con valores del 63, 57 y 45 % para los compuestos **7** (R= *n*-Bu), **10** (R= Cl-Bu) y **5** (R= Bn), respectivamente, todos ellos con piperidina en C3. Los *Derivados Clorados* mostraron un patrón similar, sin embargo sus porcentajes de bloqueo fueron ligeramente

inferiores. Sorprendentemente, los *Derivados Piridínicos*, a pesar de mantener el Br en posición C5 y que la piridina se considera un bioisóster del benceno, perdieron toda actividad, salvo el compuesto **39** ($R = \text{Bn}$, $R' = \text{CH}_3$) que mostró un 46 % de bloqueo. Las familias no halogenadas (*Derivados no sustituidos* y *Derivados Metilados*) ejercieron una modesta reducción en el $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_c$, aun con los sustituyentes del *N*-indólico más óptimos (Bn, *n*-Bu y piperidina). En la Figura 60 se representan los compuestos con mejor bloqueo del $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_c$.

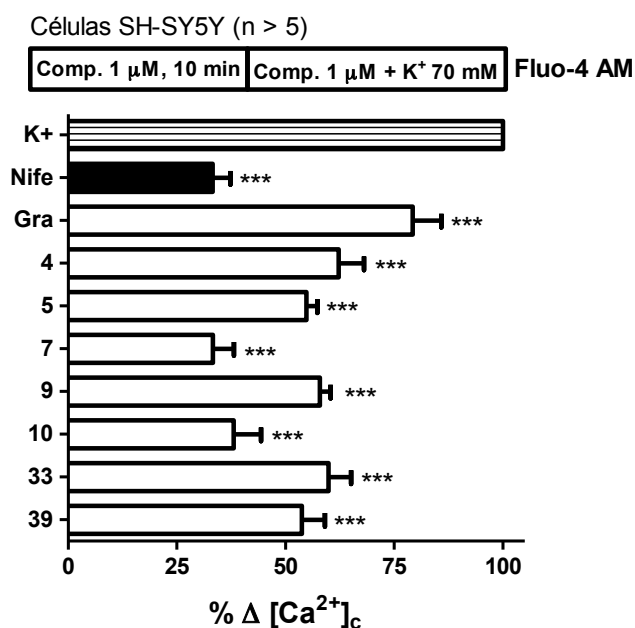


Figura 60. Representación gráfica de los compuestos con mayor bloqueo del $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_c$. Los datos se expresan como la media \pm error estándar de al menos 5 experimentos, normalizados frente al incremento en la entrada de Ca^{2+} observada en ausencia de los compuestos. Los compuestos se evaluaron a la concentración de 1 μM y el nifedipino a 3 μM . *** $p < 0,001$. Nife = nifedipino. Gra = gramina.

Efecto sobre las corrientes de Ca^{2+} mediadas por CCDV en células cromafines bovinas

Con el objetivo de profundizar en el efecto antagonista de los compuestos sobre los CCDV, se realizaron experimentos con la técnica electrofisiológica de *patch-clamp*, en la configuración de célula entera. Para ello, se seleccionaron un total de ocho compuestos, entre los cuales se incluyeron a la gramina, por tratarse del compuesto *hit*, a los derivados **5**, **7**, **9** y **10**, por sus buenos resultados en el bloqueo del $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_c$ en las células SH-SY5Y, y a los derivados **4**, **18** y **19**, que, como será expuesto más adelante, presentaron interesantes valores de neuroprotección y/o modulación de la actividad fosfatasa. En primer lugar, se aplicó un protocolo de pulsos despolarizantes (Figura 61), desde -50 mV hasta +50 mV, aumentando el potencial a intervalos de 10 mV y con cada pulso de 50 ms de duración, para seleccionar el

potencial de despolarización al que se producía la mayor corriente de Ca^{2+} de entrada (I_{Ca}). En ese momento, las ccb se sometieron a pulsos despolarizantes de 50 ms cada 20 s a dicho voltaje, normalmente -10 o 0 mV. Una vez alcanzada una respuesta estable, las células se perfundieron con los diferentes compuestos, a 1 μM , hasta que el máximo grado de bloqueo fue alcanzado. Bajo estas condiciones experimentales, los compuestos **1**, **5**, **7**, **18** y **19** inhibieron la I_{Ca} de manera estadísticamente significativa (Figura 62), confirmando su propiedades de bloqueo de los CCDV. Por último, se procedió al lavado de los compuestos mediante la perfusión de solución KH, pero el bloqueo fue prácticamente irreversible y no se consiguió volver a la situación basal. De los ocho compuestos evaluados, la gramina y los derivados **5**, **7**, **18** y **19** mostraron un bloqueo de la I_{Ca} del 43, 33, 16, 40 y 20 %, respectivamente. Sorprendentemente, los derivados **4**, **9** y **10**, a pesar de sus buenos valores de inhibición del $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$ en los experimentos de fluorescencia con células SH-SY5Y, no mostraron resultados significativos.

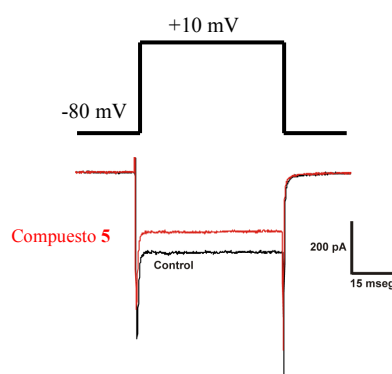


Figura 61. Registro típico de I_{Ca} y protocolo de pulso despolarizante.

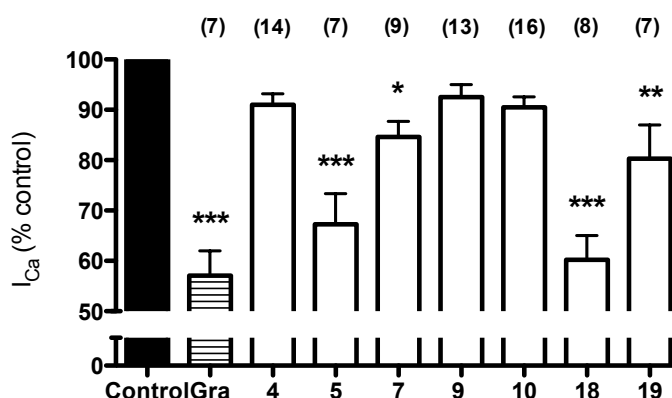


Figura 62. Efecto de la gramina y sus derivados sobre el bloqueo de las corrientes de Ca^{2+} , medidas por patch-clamp, inducidas por despolarización en células cromafines bovinas. La I_{Ca} se registró utilizando Ca^{2+} 2 mM en el medio extracelular y el potencial de membrana fijado en -80 mV. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar de al menos 7 células de al menos 3 cultivos diferentes, representándose la I_{Ca} resultante en presencia de la gramina o sus derivados a la concentración de 1 μM . *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, comparado con el control en ausencia de compuestos.

Resulta llamativo el diferente comportamiento de estos compuestos en los dos procedimientos experimentales empleados, el ensayo basado en fluorescencia y la técnica de *patch-clamp*. Si bien hay que tener en cuenta que las oscilaciones de Ca^{2+} monitorizadas con la sonda Fluo-4 pueden ser el resultado del reclutamiento de otras dianas implicadas en la regulación de la homeostasis del Ca^{2+} , estas diferencias observadas puede ser interpretadas en base a la diferente expresión de los subtipos de los CCDV en las células SH-SY5Y, donde un 50 % pertenecen al subtipo L^[306], y en las ccb, las cuales solo presentan un 20 % del subtipo L^[307]. A raíz de esta hipótesis surgió una importante cuestión, puesto que el compuesto **18** ejercía un 40 % de bloqueo de la I_{Ca} en ccb (Figura 62), pero sólo redujo el $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_c$ en células SH-SY5Y en un 20 % (Tabla 5). Se planteó la posibilidad de que los compuestos estuviesen bloqueando selectivamente los CCDV de los subtipos no L, lo que sería de gran interés teniendo en cuenta la falta de herramientas farmacológicas de naturaleza no peptídica disponibles para interactuar con los CCDV de los subtipos N y P/Q^[132], así como la potencial indicación de estos compuestos para enfermedades del sistema nervioso central sin afectación cardiovascular^[134]. Por este motivo, se registró el bloqueo de la I_{Ca} por el compuesto **18** en presencia del bloqueador selectivo de CCDV del subtipo L nifedipino, así como en presencia de la ω -conotoxina MVIIC^[308], bloqueadora de CCDV de los subtipos N y P/Q (Figura 63).

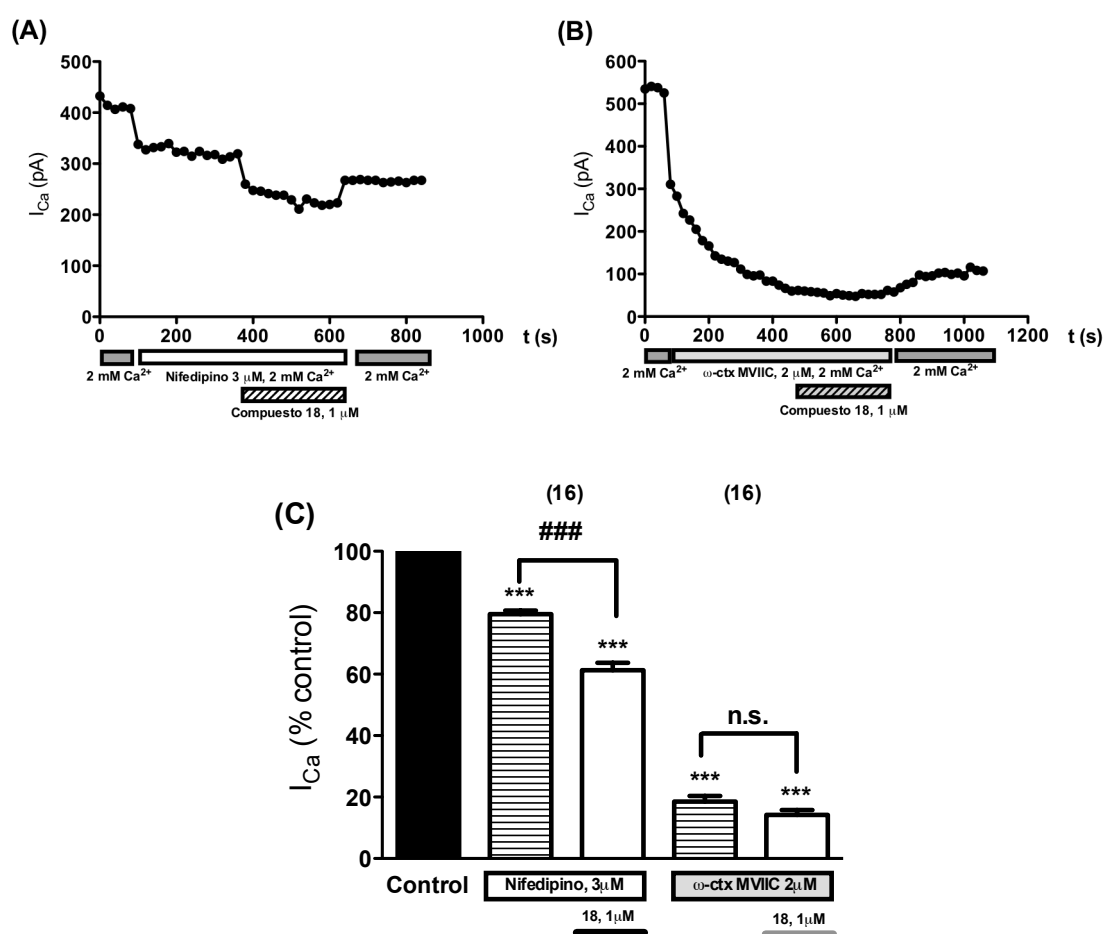


Figura 63. Disección farmacológicas del bloqueo de los CCDV por el compuesto **18**. El panel A muestra un registro temporal representativo de la I_{Ca} de una ccb perfundida con nifedipino (bloqueador de CCDV del subtipo L) a 3 μ M, solo o en presencia del compuesto **18** a 1 μ M. El panel B muestra un registro temporal representativo de la I_{Ca} de una ccb perfundida con la ω -conotoxina MVIIC (bloqueadora de CCDV de los subtipos N y P/Q) a 2 μ M, sola o en presencia del compuesto **18** a 1 μ M. El panel C muestra la media de la amplitud del pico de la I_{Ca} respecto al control (columna negra) en presencia del nifedipino o la ω -conotoxina MVIIC (columnas a rayas), por sí solos o concomitantemente con el compuesto **18** (columnas blancas). Los datos se expresan como la media \pm error estándar de 16 células por variable, de 3 cultivos diferentes. *** $p < 0,001$, respecto a las células control despolarizadas en ausencia de los compuestos; ### $p < 0,001$, respecto a las células en presencia del nifedipino; n.s.= no significativo, respecto a las células en presencia de la ω -conotoxina MVIIC.

Como se puede apreciar en el panel A, el compuesto **18** ejerció un bloqueo adicional sobre la I_{Ca} en presencia del nifedipino, es decir, que a pesar de estar los canales del tipo L bloqueados, el compuesto es capaz de actuar sobre otros subtipos de CCDV e incrementar el nivel de bloqueo de la I_{Ca} . Por el contrario, la I_{Ca} observada en presencia de la ω -conotoxina MVIIC no se ve afectada cuando se administra el compuesto (panel B), presumiblemente porque los canales sobre los que actúa ya han sido bloqueados. De esta manera, podemos deducir que el compuesto **18** está actuando como un bloqueador selectivo para los subtipos de CCDV no L. Esto explicaría la menor inhibición del $\Delta[Ca^{2+}]_c$ en los experimentos de fluorescencia, donde las células SH-SY5Y presentan menor porcentaje de canales N y P/Q, pero su mayor bloqueo en la I_{Ca} en ccb, donde los CCDV no L son mayoritarios. Unos resultados similares se obtuvieron con la gramina, con un 25 y un 43 % de bloqueo, respectivamente.

No obstante, aunque ha quedado confirmado que la gramina y algunos de sus derivados son capaces de antagonizar los CCDV, no se puede generalizar la misma selectividad para toda la familia. Especialmente en el caso de los *Derivados Bromados*, teniendo en cuenta la existencia de derivados descritos capaces de actuar sobre los CCDV del subtipo L ^[242], habría que descartar una inhibición no selectiva de CCDV. De hecho, como se observa en la Figura 62, los derivados bromados **4**, **9** y **10** no muestran un bloqueo de las I_{Ca} , a pesar de sus buenos valores de inhibición del $\Delta[Ca^{2+}]_c$ en células SH-SY5Y. Para explicar esta aparente contradicción se decidió explorar para estos tres compuestos su efecto sobre la I_{Ca} aplicando un protocolo diferente, realizando curvas de intensidad de corriente frente a voltaje (I/V), desde -60 hasta +60 mV, para cada uno de estos tres compuestos y comparándolas con curvas I/V controles. En la Figura 64, se puede observar cómo las curvas correspondientes a los derivados **4** y **10** se desplazan ligeramente hacia la izquierda, en comparación con las curvas control, lo cual, de manera indirecta, podría estar indicando un bloqueo de los CCDV de tipo no L, basado en la cinética de activación e inactivación de los diferentes subtipos de los CCDV. Es posible que, si

en lugar de evaluar el bloqueo de la I_{Ca} por los compuestos a 0 mV, se hubiesen utilizado voltajes mayores (aquellos en los que se aprecian diferencias estadísticamente significativas en las curvas I/V), sí se hubiese encontrado cierto bloqueo de la I_{Ca} . Aun así, el bloqueo presentado por los derivados bromados **7** y **10** (un 63 y 57 %, respectivamente) es incluso mayor que el porcentaje de CCDV de los subtipos no L presente en las células SH-SY5Y (aproximadamente un 50 %), lo que conduce a pensar en un posible bloqueo de CCDV del tipo L en el caso de estos dos compuestos.

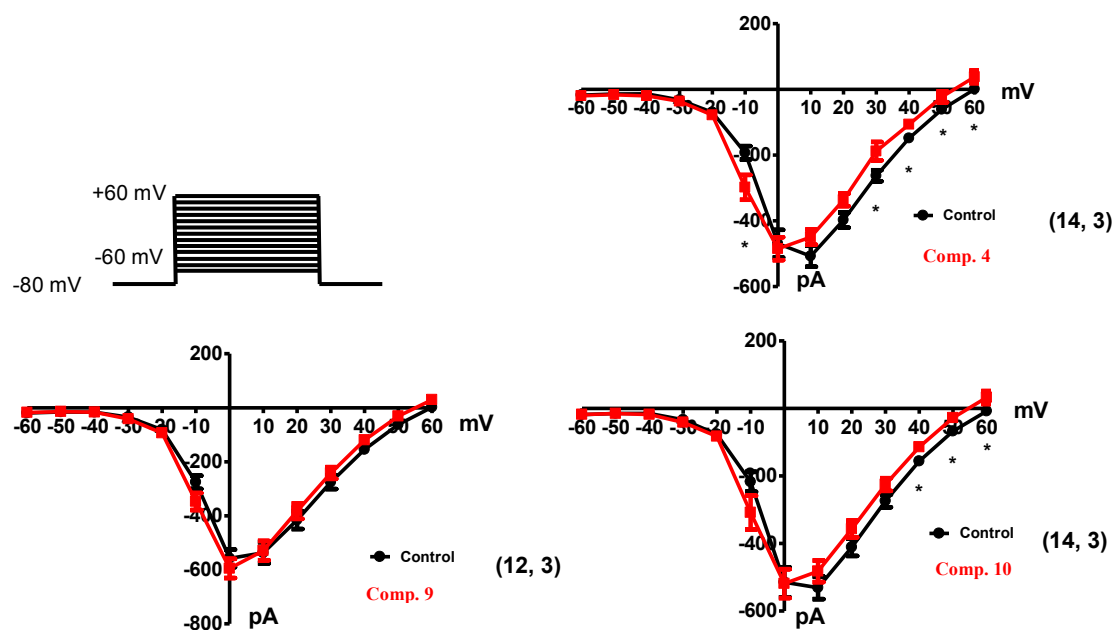


Figura 64. Protocolo aplicado y curvas I/V en presencia de los derivados **4**, **9** y **10**. Los compuestos se evaluaron a 1 μ M. Los datos se expresan como la media \pm error estándar de al menos 12 células para cada variable, de 3 cultivos diferentes. * $p < 0,05$, respecto a las células control despolarizadas en ausencia de los compuestos.

Por último, a *grosso modo*, a partir de los registros obtenidos con el protocolo del pulso despolarizante, podemos estudiar el efecto de los compuestos sobre las corrientes de Na^+ (I_{Na}). De los ocho compuestos evaluados, dos de ellos (los derivados **7** y **18**) bloquean la I_{Na} de manera estadísticamente significativa, aunque sólo supone un 10 % de bloqueo con respecto al control.

En resumen, se ha confirmado la capacidad para bloquear los CCDV por la gramina y sus derivados, presumiblemente a través del antagonismo de CCDV de los tipos N y P/Q. Sorprendentemente, teniendo en cuenta las relaciones estructura-actividad establecidas en el apartado anterior, el mejor compuesto no es un derivado bromado sino el derivado metilado **18**. En mi opinión, si bien el mecanismo de bloqueo de la gramina y sus derivados parece ir

mediado por los CCDV de los subtipos N o P/Q, la presencia de bromo en los compuestos incrementa el bloqueo a través del reclutamiento adicional de los CCDV del subtipo L.

5.2. Efecto sobre las Ser/Thr fosfatasas

En primer lugar, se realizaron ensayos en presencia de AO para determinar la capacidad de la gramina y sus derivados para mantener la actividad fosfatasa total. Asimismo, se seleccionaron las familias de los *Derivados Bromados*, los *Derivados Metilados*, la gramina y su homólogo con piperidina (**25**), para el estudio de la actividad Ser/Thr fosfatasa, medida en presencia del inhibidor de Tyr fosfatasas NaVO₃. Por último, se aplicaron técnicas computacionales de *docking* molecular para el análisis de la interacción de los mejores compuestos con la subunidad C de PP2A.

Efecto sobre la actividad fosfatasa total y la actividad Ser/Thr fosfatasa

Existen diferentes alternativas para medir la actividad fosfatasa de una muestra biológica, ya sea mediante ensayos colorimétricos o métodos radioactivos. Estos últimos son la manera clásica de medir la actividad fosfatasa, mediante el uso de sustratos marcados con [γ -³²P]-ATP ^[309] que, si bien presentan la ventaja de ser una medida muy precisa de la cinética de la reacción de desfosforilación, tienen el gran inconveniente de su naturaleza radiactiva. En relación a los ensayos colorimétricos, el método del verde malaquita y el del *p*-nitrofenilfosfato (*p*NPP) son los más utilizados. El verde malaquita es un compuesto capaz de formar complejos con los fosfatos libres en solución acuosa, los cuales absorben a una longitud de onda de 620 nm ^[310]. Se trata de un ensayo preciso pero complicado, puesto que requiere el aislamiento por inmunoprecipitación de la enzima fosfatasa, la limpieza de la muestra biológica de fosfatos y la necesidad de añadir exógenamente un sustrato o péptido fosforilado, lo cual encarece el ensayo ^[219]. En cuanto al método del *p*NPP, esta sustancia actúa como sustrato cromogénico para la mayoría de las enzimas fosfatasas (Tyr fosfatasas y Ser/Thr fosfatasas), las cuales, al desfosforilarlo, generan *p*-nitrofenol, que en condiciones alcalinas produce el *p*-nitrofenolato, que presenta una gran absorbancia a 405 nm ^[219]. Se trata de un método sencillo, puesto que no requiere de un tratamiento específico de las muestras, y económico, apto para el cribado farmacológico de un gran número de compuestos. Por ello, el método de elección fue el ensayo colorimétrico del *p*NPP. No obstante, es un método inespecífico, puesto que mide la actividad fosfatasa total de la muestra, pero en presencia de un inhibidor específico de Ser/Thr fosfatasas, como el AO, se acepta que los cambios en la absorbancia se deben a la actividad de enzimas Ser/Thr fosfatasas ^[219]. Aun así, además de medir la actividad fosfatasa total de las muestras en

presencia de AO, se realizaron medidas en presencia de NaVO_3 , un inhibidor específico de las enzimas Tyr fosfatasas ^[311]. Bajo estas condiciones experimentales, y dado que la actividad de AO sobre las PPP es insensible a NaVO_3 ^[76], la actividad fosfatasa registrada corresponde únicamente a la de las enzimas Ser/Thr fosfatasas.

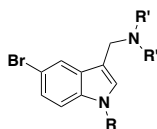
Se llevó a cabo la puesta a punto del ensayo en base a los experimentos de neuroprotección con AO, modificándose ligeramente el protocolo utilizado puesto que era necesaria una concentración de AO capaz de inhibir a las enzimas PPP, pero sin llegar a causar muerte celular, ya que eso disminuiría la actividad fosfatasa registrada, no por inhibición de las enzimas sino por un menor número de células viables en los pocillos. Se redujo la concentración de AO de 20 a 15 nM, una concentración todavía adecuada para inhibir PP1 y PP2A ^{[312] [69] [219]}, así como el tiempo de exposición de 20 a 18 h. Bajo estas condiciones experimentales, el AO disminuyó la actividad fosfatasa total en un 32 %, de manera estadísticamente significativa, pero sin afectar a la viabilidad celular, medida por el método de la reducción del MTT. De esta manera, se establece una ventana adecuada entre la actividad fosfatasa de los pocillos sin tratamiento y los pocillos tratados con AO, dentro de la cual los compuestos pueden mostrar su capacidad para mantener la actividad Ser/Thr fosfatasa en presencia del inhibidor AO.

Como se ha expuesto en el *VIII. 1.2.*, la gramina mostró un excelente perfil neuroprotector frente a la toxicidad inducida por el AO a todas las concentraciones evaluadas (1 nM - 30 μM). Además, su conformación más estable, generada en los estudios de *docking*, muestra que la gramina se aproxima a la enzima PP2A por una cavidad hidrofóbica presente en su subunidad C, presentando interacciones con ella pero sin afectar al sitio catalítico, por lo que teóricamente debería evitar la unión de inhibidores, como el AO, pero sin afectar a la actividad fosfatasa de la enzima. Aunque ambos modelos experimentales indican, de manera indirecta, que la gramina es capaz de modular la actividad Ser/Thr fosfatasa, el método del *pNPP* permitiría su confirmación. Así, se evaluó el efecto de la gramina sobre la actividad fosfatasa total, en la concentración de 0,1 μM , en presencia del inhibidor AO a 15 nM y durante 18 h (Tabla 6). Confirmando la hipótesis, la gramina fue capaz de mantener la actividad fosfatasa en un 40 %, igualando a la memantina, utilizada como estándar a 10 nM por su capacidad descrita de activar PP2A ^[111]. Además, para descartar una activación directa de las enzimas Ser/Thr fosfatasas, hecho que podría conllevar numerosos efectos adversos dada la diversidad e importancia de sus funciones celulares, se registró la actividad fosfatasa en presencia únicamente de la gramina, a las concentraciones de 0,1 y 1 μM . Bajo estas condiciones experimentales, no existen diferencias estadísticamente significativas con los valores registrados en células sin tratar. En otras palabras, la gramina no mostró ningún efecto potenciador de la actividad fosfatasa celular

en ausencia del AO, por lo que parece requerir de la presencia de un inhibidor con el cual competir para así mostrar su capacidad para mantener la actividad enzimática.

A continuación, se evaluaron todos los derivados de gramina en las mismas condiciones experimentales. En la Tabla 6 se puede observar cómo, de los 46 compuestos evaluados, 29 fueron capaces de evitar la inhibición inducida por el AO, alcanzando un incremento de hasta el 50 % en la actividad fosfatasa total, comparado con los valores de AO en ausencia de los compuestos. Las mejores actividades se observan en los derivados **33** (54 %), **26** (49 %), **30** (52 %), **38** (42 %) y **40** (41 %). No obstante, la media de todos los compuestos con valores estadísticamente significativos se encuentra entorno al 35 %, similar al obtenido con el control memantina.

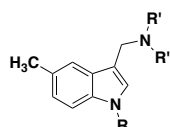
Resultados muy similares se obtuvieron al repetir los experimentos en presencia del inhibidor de Tyr fosfatasas NaVO_3 ^[311], administrado a las células a 1 mM (Tabla 6). En este caso, sólo las familias de los *Derivados Bromados*, los *Derivados Metilados*, la gramina y su homólogo con piperidina (**25**) se evaluaron, siendo el principal motivo el alto error inherente a la medida. Dado que la actividad Tyr fosfatasa supone un 70 % de la actividad fosfatasa celular ^[311], al abolirla mediante el inhibidor NaVO_3 , la señal de absorbancia restante es muy pequeña, lo que conlleva mayores errores a la hora de registrar las señales. Por ello, una vez confirmado que los resultados corroboraban los valores obtenidos al medir la actividad fosfatasa total, se decidió no cribar el resto de derivados en este modelo y extrapolar los resultados de actividad fosfatasa total a actividad Ser/Thr fosfatasa, ya que, como se ha mencionado previamente, al ser medido en presencia del AO, la actividad registrada se puede aceptar que es únicamente debida a las Ser/Thr fosfatasas ^[219]. Como se puede observar en la Tabla 6, 11 de los 25 compuestos evaluados son capaces de paliar la reducción de la actividad Ser/Thr fosfatasa inducida por AO, de manera estadísticamente significativa, corroborando los resultados obtenidos en ausencia de NaVO_3 .



<i>Derivados Bromados</i>	R	R'	% Actividad fosfatasa Total	% Actividad Ser/Thr fosfatasa
Basal	-	-	100	100
AO	-	-	68 ± 2 ^{###}	61 ± 3 ^{###}
Memantina	-	-	77 ± 3 [*]	78 ± 5 ^{***}
2	H	CH ₃	80 ± 4 ^{**}	76 ± 6 [*]

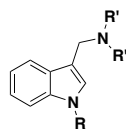
3	H	-(CH ₂) ₅ -	74 ± 4 ^{n.s.}	67 ± 3 ^{n.s.}
4	Bn	CH ₃	81 ± 4 ^{**}	78 ± 5 [*]
5	Bn	-(CH ₂) ₅ -	79 ± 4 [*]	70 ± 7 ^{n.s.}
6	<i>n</i> -Bu	CH ₃	81 ± 6 [*]	76 ± 4 [*]
7	<i>n</i> -Bu	-(CH ₂) ₅ -	78 ± 3 [*]	79 ± 4 ^{**}
8	CH ₂ C≡CH	CH ₃	70 ± 5 ^{n.s.}	64 ± 4 ^{n.s.}
9	CH ₂ C≡CH	-(CH ₂) ₅ -	77 ± 3 ^{**}	72 ± 5 ^{n.s.}
10	-(CH ₂) ₄ Cl	-(CH ₂) ₅ -	68 ± 3 ^{n.s.}	62 ± 7 ^{n.s.}
11	-(CH ₂) ₄ Pi	CH ₃	73 ± 5 ^{n.s.}	68 ± 5 ^{n.s.}
12	-(CH ₂) ₄ Pi	-(CH ₂) ₅ -	73 ± 2 [*]	70 ± 4 ^{n.s.}
13	-(CH ₂) ₃ CO ₂ Et	CH ₃	76 ± 7 ^{n.s.}	66 ± 4 ^{n.s.}
14	-(CH ₂) ₃ CO ₂ Et	-(CH ₂) ₅ -	73 ± 2 ^{n.s.}	71 ± 3 [*]

*Pi= piperidinil

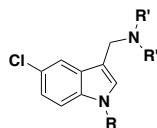


<i>Derivados</i>	R	R'	% Actividad fosfatasa Total	% Actividad Ser/Thr fosfatasa
<i>Metilados</i>				
Basal	-	-	100	100
AO	-	-	68 ± 2 ^{###}	61 ± 3 ^{###}
Memantina	-	-	77 ± 3 [*]	78 ± 5 ^{***}
15	H	CH ₃	79 ± 4 [*]	77 ± 4 [*]
16	H	-(CH ₂) ₅ -	71 ± 3 ^{n.s.}	69 ± 5 ^{n.s.}
17	Bn	CH ₃	73 ± 3 ^{n.s.}	66 ± 5 ^{n.s.}
18	Bn	-(CH ₂) ₅ -	77 ± 4 [*]	78 ± 6 [*]
19	<i>n</i> -Bu	-(CH ₂) ₅ -	69 ± 2 ^{n.s.}	66 ± 6 ^{n.s.}
20	CH ₂ C≡CH	CH ₃	80 ± 4 [*]	74 ± 9 [*]
21	CH ₂ C≡CH	-(CH ₂) ₅ -	71 ± 3 ^{n.s.}	66 ± 7 ^{n.s.}
22	-(CH ₂) ₄ Cl	-(CH ₂) ₅ -	71 ± 4 ^{n.s.}	62 ± 6 ^{n.s.}
23	-(CH ₂) ₄ Pi	CH ₃	74 ± 3 ^{n.s.}	68 ± 5 ^{n.s.}
24	-(CH ₂) ₄ Pi	-(CH ₂) ₅ -	72 ± 3 ^{n.s.}	70 ± 5 [*]

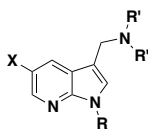
*Pi= piperidinil



<i>Derivados no sustituidos</i>	R	R'	% Actividad fosfatasa Total	% Actividad Ser/Thr fosfatasa
Basal	-	-	100	100
AO	-	-	68 ± 2 ^{###}	61 ± 3 ^{###}
Memantina	-	-	77 ± 3 [*]	78 ± 5 ^{***}
Gramina (1)	H	CH ₃	80 ± 5 [*]	76 ± 5 [*]
25	H	-(CH ₂) ₅ -	76 ± 4 [*]	79 ± 8 [*]
26	Bn	CH ₃	85 ± 4 ^{**}	
27	Bn	-(CH ₂) ₅ -	82 ± 4 ^{**}	
28	<i>n</i> -Bu	CH ₃	78 ± 4 ^{n.s.}	
29	<i>n</i> -Bu	-(CH ₂) ₅ -	82 ± 3 [*]	
30	CH ₂ C≡CH	CH ₃	86 ± 4 ^{**}	
31	CH ₂ C≡CH	-(CH ₂) ₅ -	81 ± 4 ^{n.s.}	



<i>Derivados Clorados</i>	R	R'	% Actividad fosfatasa Total
Basal	-	-	100
AO	-	-	68 ± 2 ^{###}
Memantina	-	-	77 ± 3 [*]
32	H	-(CH ₂) ₅ -	82 ± 3 ^{**}
33	Bn	CH ₃	86 ± 6 ^{**}
34	Bn	-(CH ₂) ₅ -	79 ± 6 ^{n.s.}
35	<i>n</i> -Bu	CH ₃	80 ± 4 [*]
36	<i>n</i> -Bu	-(CH ₂) ₅ -	83 ± 5 ^{**}
37	CH ₂ C≡CH	CH ₃	81 ± 2 [*]
38	CH ₂ C≡CH	-(CH ₂) ₅ -	86 ± 4 ^{**}



<i>Derivados</i>	X	R	R'	% Actividad
<i>Piridínicos</i>				fosfatasa Total
Basal	-	-	-	100
AO	-	-	-	68 ± 2 ^{###}
Memantina	-	-	-	77 ± 3 [*]
39	Br	Bn	CH ₃	81 ± 5 [*]
40	Br	Bn	-(CH ₂) ₅ -	82 ± 4 ^{**}
41	Br	<i>n</i> -Bu	CH ₃	80 ± 4 [*]
42	Br	<i>n</i> -Bu	-(CH ₂) ₅ -	80 ± 5 [*]
43	Br	CH ₂ C≡CH	CH ₃	82 ± 4 [*]
44	Br	CH ₂ C≡CH	-(CH ₂) ₅ -	81 ± 3 ^{n.s.}
45	CH ₃ O	Bn	CH ₃	83 ± 3 ^{**}
46	CH ₃ O	Bn	-(CH ₂) ₅ -	84 ± 4 [*]

Tabla 6. Efecto de la gramina y sus derivados sobre la actividad fosfatasa total y la actividad Ser/Thr fosfatasa. Tras 24 h de incubación con los compuestos, las células SH-SY5Y se expusieron al AO 15 nM y a los compuestos durante 18 h. La actividad fosfatasa se midió por el método del pNPP, en presencia de NaVO₃ en el caso de la actividad Ser/Thr fosfatasa. Los datos se expresan como la media ± el error estándar de al menos 5 experimentos. Los compuestos se evaluaron a la concentración de 0,1 μM y la memantina a 10 nM. ^{###}*p* < 0,001, respecto a las células sin tratar; ^{***}*p* < 0,001, ^{**}*p* < 0,01, ^{*}*p* < 0,05 y n.s. = no significativo, respecto a las células tratadas con el AO.

En cuanto a las relaciones estructura-actividad, las posiciones que más han afectado a la actividad son la *N*-alquilación y las sustituciones en el anillo bencénico fusionado. Los grupos bencilo, butilo y propargilo que penden del *N*-indólico mostraron las actividades más óptimas, al contrario que los grupos Cl-butilo, piperidinil y butirato de etilo. Respecto a las modificaciones sobre el anillo bencénico fusionado, tanto la no sustitución, como la introducción de un Cl en C5 o la modificación por un anillo de piridina, ofrecen excelentes resultados, mostrando una buena actividad fosfatasa en prácticamente todos sus derivados, encontrándose los mejores compuestos dentro de estas familias (Figura 65). En la familia *Derivados Piridínicos*, el cambio del Br, presente en los derivados **39** y **40**, por el grupo CH₃O, que caracteriza a los derivados **45** y **46**, no supone un aumento en su actividad, ya que los cuatro compuestos mantienen la actividad fosfatasa de forma similar (35 %). La presencia de dimetilamina o piperidina en C3 no se puede asociar con un aumento o disminución en la actividad. Al contrario de lo esperado, tampoco la introducción de una segunda amina con

carácter catiónico a pH fisiológico conlleva un incremento en la actividad fosfatasa (11, 12, 23, 24). De hecho, su actividad se ve reducida, posiblemente por el gran tamaño del sustituyente que dificultaría el atraque e interacción de la molécula con su sitio de unión en PP2A.

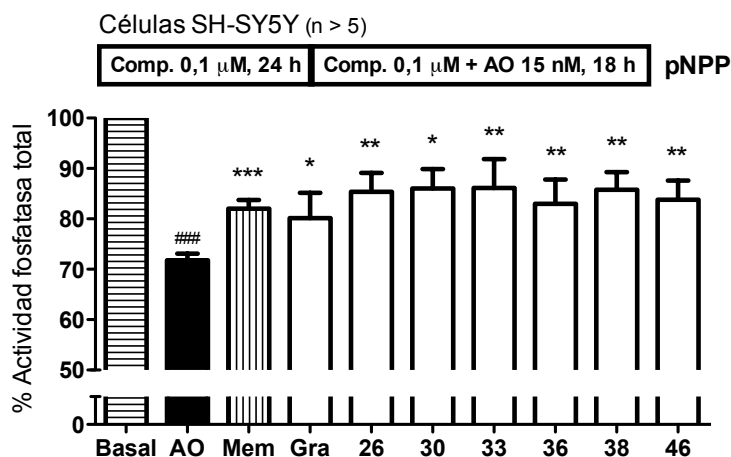


Figura 65. Representación gráfica de los compuestos con mejor actividad Ser/Thr fosfatasa. Los datos se expresan como la media \pm el error estándar de al menos 5 experimentos, normalizados frente a la actividad fosfatasa observada en ausencia de los compuestos. Los compuestos se evaluaron a la concentración de 0,1 μ M y la memantina a 10 nM. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$. Mem = memantina. Gra = gramina.

Estudio de docking molecular de los mejores compuestos y PP2Ac

Con el objetivo de profundizar y complementar los estudios sobre la actividad fosfatasa, se analizó, mediante técnicas de *docking* molecular, la interacción entre PP2Ac y algunos de los derivados de gramina sintetizados. Los derivados 33 y 46 se seleccionaron por su destacable actividad fosfatasa. El derivado 18 se eligió por ser el compuesto de mayor interés en términos de bloqueo de los CCDV de los subtipos N y P/Q, y el 6 por interés estructural en las posibles interacciones de su sustituyente butilo, ya que el resto de derivados seleccionados poseían un resto bencilo.

La conformación más estable generada en la interacción del derivado 6 con PP2Ac mostró posibles interacciones con los aminoácidos Ala 216 (interacción hidrofóbica entre el butilo del compuesto y el metilo del aminoácido, $d = 3,86 \text{ \AA}$), Trp 200 (interacción hidrofóbica plana π - π entre los anillos bencénicos, $d = 4,05 \text{ \AA}$), His 191 (interacción de Van der Waals tipo ion dipolo-dipolo inducido entre el butilo y el aminoácido de carga positiva histidina, $d = 3,60 \text{ \AA}$), Gln 122 (interacción ion-dipolo entre el nitrógeno de la dimetilamina y la amida de la glutamina, $d = 4,12 \text{ \AA}$) y Ser 120 (enlace de hidrógeno fuerte entre el nitrógeno protonado de la dimetilamina y el hidroxilo de la serina, $d = 1,70 \text{ \AA}$) (Figura 66). Por tanto, la cadena hidrocarbonada en posición

N_1 indólico favorece nuevas interacciones hidrofóbicas con la enzima, lo que puede explicar los buenos resultados sobre la actividad fosfatasa de los derivados de gramina con *n*-Bu.

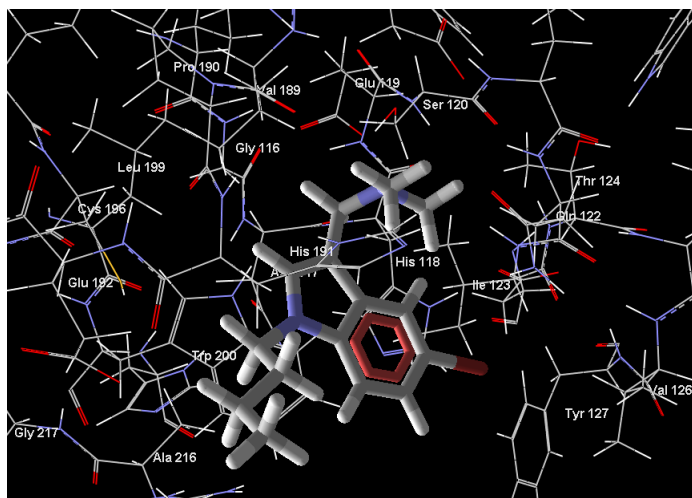


Figura 66. Ampliación de los residuos con los que el derivado **6** puede interaccionar, en un radio de 8 Å.

El derivado **33**, el mejor compuesto activador de fosfatasa de esta Memoria de Tesis, adopta una pose capaz de establecer un enlace de hidrógeno fuerte entre el nitrógeno protonado de la dimetilamina del compuesto y el grupo hidroxilo de la Ser 120 ($d=1,75$ Å). También presenta una interacción hidrofóbica plana π - π con el Trp 200 ($d=4,04$ Å), así como una interacción iónica de transferencia de carga con la His 191 ($d=3,06$ Å) (Figura 68). Otra de las poses del compuesto **33** generada por el programa de *docking* molecular, muestra un posible enlace de halógeno entre el cloro y el oxígeno de la Ser 120 ($d=3,66$ Å) (Figura 68). No obstante, los enlaces de halógeno son más débiles e infrecuentes que los enlaces de hidrógeno ^[262], por lo que la pose más probable sería la que presenta el enlace de hidrógeno fuerte (Figura 67).

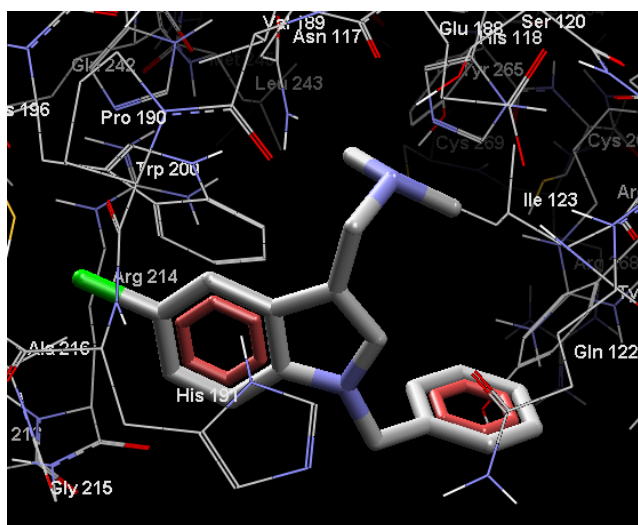


Figura 67. Ampliación de los residuos con los que el derivado **33** puede interaccionar, en un radio de 8 Å.

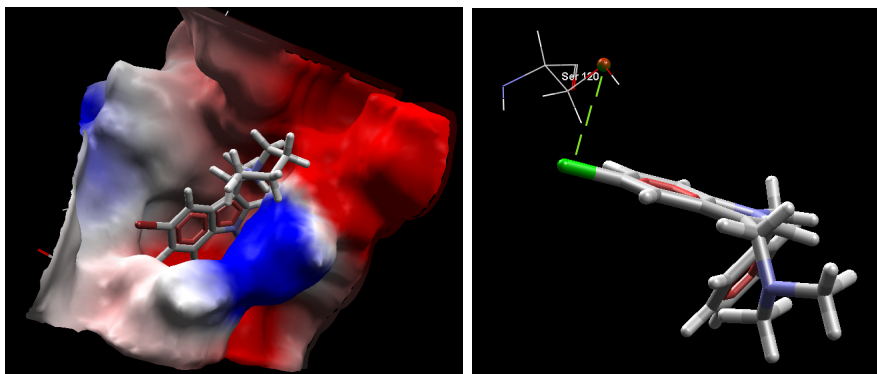


Figura 68. Izquierda, detalle de la interacción iónica de transferencia de carga presente entre el anillo indólico y el aminoácido con carga positiva His 191. Derecha, detalle del posible enlace de halógeno entre el oxígeno del grupo hidroxilo de la Ser 120 y el átomo de cloro del compuesto **33** ($d = 3.66$ Å).

En general, la familia de *Derivados Piridínicos* destaca por el buen mantenimiento de la actividad fosfatasa, sobresaliendo el derivado **46**. El estudio de su *docking* molecular es de especial interés dado que presenta piperidina, bioisómero del benceno, como anillo fusionado al pirrol, y un grupo OCH_3 en posición C5, ambos propuestos durante la fase de diseño con el fin de favorecer nuevas interacciones. Si bien no se ha encontrado ninguna interacción con el nitrógeno de la piridina, el oxígeno del grupo metoxilo es capaz de aceptar un enlace de hidrógeno del hidroxilo de la Ser 120 ($d = 2.23$ Å). Además, este compuesto se adapta muy bien al bolsillo hidrofóbico, presentando numerosas interacciones con los residuos Ala 216 (con la cadena hidrocarbonada de la piperidina, $d = 3.59$ Å), Ile 123 (con el grupo bencilo, $d = 4.01$ Å) y Val 126 (con el grupo bencilo, $d = 3.86$ Å) (Figura 69).

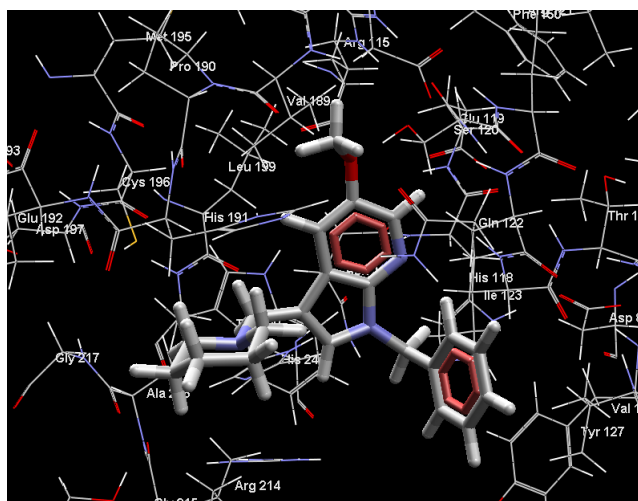


Figura 69. Ampliación de los residuos con los que el derivado **46** puede interaccionar, en un radio de 8 Å.

Por último, el complejo entre el derivado **18** y PP2Ac reveló interacciones entre el anillo de piperidina del compuesto y la cadena lateral de los residuos Ile 123 ($d = 3.85$ Å) y Val 189 ($d =$

1,76 Å) (Figura 70). Su anillo indólico también es capaz de contactar con el anillo de imidazol de la His 191, mediante una interacción iónica de transferencia de carga ($d= 3,06$ Å) (Figura 68), así como con el anillo indólico del Trp 200, probablemente mediante una interacción hidrofóbica plana tipo π - π ($d= 4,65$ Å). Además, el nitrógeno protonado de la piperidina del compuesto **18**, puede formar un enlace de hidrógeno fuerte con el grupo hidroxilo de la Ser 120 ($d= 1,66$ Å), lo que contribuye a la afinidad del ligando por este sitio de unión en PP2A (Figura 70).

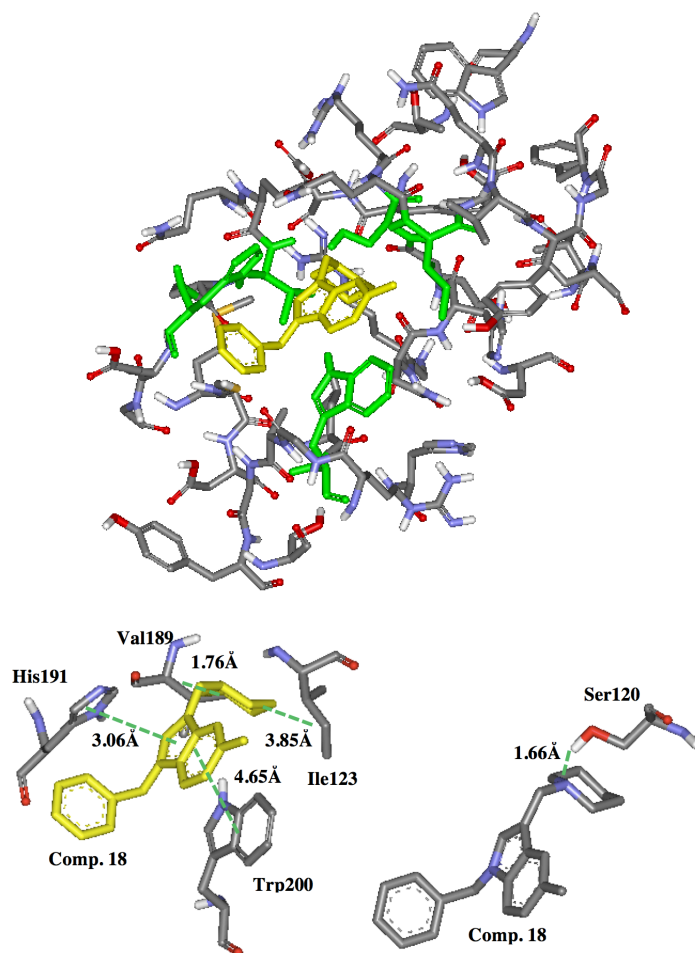


Figura 70. Docking del complejo formado entre el compuesto **18** y PP2Ac. Arriba, pose del compuesto 18 (amarillo) en el bolsillo de unión de PP2Ac (residuos principales en verde). Abajo, interacciones de Van der Waals (Val 189 e Ile 123), interacciones hidrofóbicas π (His 191 y Trp 200) y enlace de hidrógeno (Ser 120). Modificadas de Lajarín-Cuesta y col., 2016.

Los resultados de *docking* para estos cuatro complejos permiten deducir los residuos clave en la interacción entre los derivados de gramina y PP2Ac (Tabla 7). Al igual que la gramina, sus derivados adoptan una pose a lo largo de la cavidad hidrofóbica de PP2Ac que permite la unión del sustrato pero no la unión del inhibidor AO (ni presumiblemente la unión de inhibidores endógenos) (Figura 71). Esta orientación, lejos del sitio catalítico, está estabilizada por las interacciones con los residuos del bolsillo hidrofóbico (Ile 123, His 191, Trp 200), así como con

otros aminoácidos cercanos (por ejemplo, Ser 120 o Val 180). Así, se ratifica la estrategia de diseño de los derivados, ya que la introducción de sustituyentes más hidrofóbicos, como el bencilo o el butilo, ha conseguido incrementar el número de interacciones entre los ligandos y la proteína, en comparación con la gramina, aumentando así su afinidad por ella, lo que está en concordancia con los mejores resultados experimentales de actividad fosfatasa.

	Sitio catalítico	Bolsillo hidrófobo	Ácido okadaico	Gramina	Derivados
PP2Ac	Arg 89	Gln 122	Arg 89	Pro 190	Ser 120
	Tyr 127	Ile 123	His 191	His 191	Gln 122
	Arg 214	His 191	Trp 200	Trp 200	Ile 123
	Leu 243	Trp 200	Leu 243		Val 126
	Tyr 265		Tyr 265		Val 180
	Arg 268		Cys 266		Val 189
	Cys 269		Arg 268		His 191
			Cys 269		Trp 200
					Ala 216

Tabla 7. Relación de los aminoácidos involucrados en las interacciones entre PP2Ac, el AO, la gramina y sus derivados.

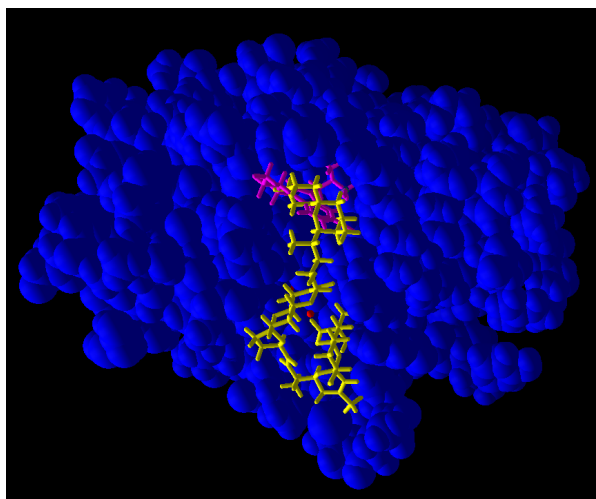


Figura 71. Bolsillo de unión común a todos los derivados de gramina en PP2Ac. Ácido okadaico, en amarillo; derivado de gramina, en morado; PP2Ac, en azul.

5.3. *Derivados de gramina con actividad multidiana sobre los CCDV y la actividad fosfatasa*

En resumen, como se observa en la Tabla 8, un total de 13 derivados (**4, 5, 7, 9, 12, 18, 25, 26, 33, 35, 36, 38, 39**), junto con la gramina (**1**), han mostrado una actividad multidiana, ejerciendo un bloqueo sobre los CCDV a la vez que un mantenimiento de la actividad Ser/Thr fosfatasa. Los sustituyentes óptimos para favorecer esta actividad dual son los halógenos en el C5 del anillo indólico, así como los grupos bencilo, butilo o propargilo sobre el nitrógeno indólico. El hecho de que la amina terciaria sea dimetilamina o piperidina no parece tener especial relevancia.

Las propiedades mostradas por la gramina (**1**) (25 % de bloqueo de los CCDV y 39 % de mantenimiento de la actividad fosfatasa), son igualadas por algunos de los compuestos (**25, 35 o 36**) o incluso ligeramente mejoradas por otros, como por ejemplo los compuestos **4** (38 % de bloqueo de CCDV y 47 % de mantenimiento de la actividad fosfatasa), **33** (40 % de bloqueo de CCDV y 52 % de mantenimiento de la actividad fosfatasa) o **38** (33 % de bloqueo de CCDV y 42 % de mantenimiento de la actividad fosfatasa), aunque no se encuentran diferencias estadísticamente significativas con respecto a los resultados con gramina.

Si bien algunos compuestos mostraron actividad sobre los CCDV o modulación de las Ser/Thr fosfatasas, 10 compuestos (**3, 8, 11, 13, 14, 16, 17, 23, 24 y 28**) no ejercieron ningún efecto, a las concentraciones evaluadas, frente a las dianas estudiadas. Si analizamos la estructura de estos compuestos, la mitad de ellos comparten el hecho de presentar un sustituyente muy voluminoso en el nitrógeno indólico, bien sea piperidinil o butirato de etilo.

Es interesante resaltar el hecho de que, aunque ambas dianas son de interés por sí mismas, su abordaje simultáneo puede ofrecer no sólo un efecto aditivo sino sinérgico, dado que se encuentran interconectadas. Numerosos estudios han demostrado el papel de PP1 y PP2A en la regulación del estado de fosforilación de los canales CCDV tipo L, modulando procesos de excitación-contracción en cardiomiocitos y células contráctiles del músculo liso ^[313]. Ambas fosfatasas modulan la cinética de los canales Ca_v1.2, de manera que su inhibición conduce a un aumento en las probabilidades de apertura de los canales, provocando una mayor entrada de Ca²⁺ en las células ^[314]. La estimulación β-adrenérgica controla la frecuencia cardíaca a través de la activación de la PKA, la cual fosforila a Ca_v1.2 en la subunidad α1 del poro del canal (Ser 1928), aumentando su permeabilidad. PP2A se encuentra asociada constitutivamente a Ca_v1.2 por el extremo C terminal (concretamente en Ser 1866) ^[315] y es la responsable de contrarrestar esta fosforilación en Ser 1928 ^[316]. Sin embargo, esta regulación se pierde ante un fallo

cardíaco, estando muy disminuida la actividad de PP2A y su asociación con $Ca_v1.2$. en los corazones infartados ^[316]. Análogamente, PP1 es la responsable de contrarrestar la actividad de la PKC sobre $Ca_v1.2$. ^[317]. Menos conocimiento se tiene sobre cuáles son las fosfatasa implicadas en la regulación del estado de fosforilación de los CCDV a nivel del sistema nervioso central. Según Oliveria y col., la principal fosfatasa responsable de regular las corrientes por los CCDV tipo L en neuronas sería la calcineurina, y no PP1 o PP2A ^[318].

Tabla 8. Resumen de los efectos sobre el bloqueo de los CCDV y el mantenimiento de la actividad Ser/Thr fosfatasa de la gramina y sus derivados.

Gramina y derivados	Actividad CCDV	Actividad fosfatasa	Actividad multidiana
1	**	*	DUAL
2	n.s.	**	
3	n.s.	n.s.	
4	***	**	DUAL
5	***	*	DUAL
6	n.s.	*	
7	***	*	DUAL
8	n.s.	n.s.	
9	***	**	DUAL
10	***	n.s.	
11	n.s.	n.s.	
12	*	*	DUAL
13	n.s.	n.s.	
14	n.s.	n.s.	
15	n.s.	*	
16	n.s.	n.s.	
17	n.s.	n.s.	
18	*	*	DUAL
19	*	n.s.	
20	n.s.	*	
21	**	n.s.	
22	***	n.s.	
23	n.s.	n.s.	

Gramina y derivados	Actividad CCDV	Actividad fosfatasa	Actividad multidiana
24	n.s.	n.s.	
25	**	*	DUAL
26	*	**	DUAL
27	n.s.	**	
28	n.s.	n.s.	
29	n.s.	*	
30	n.s.	**	
31	**	n.s.	
32	n.s.	**	
33	***	**	DUAL
34	***	n.s.	
35	*	*	DUAL
36	*	**	DUAL
37	n.s.	*	
38	**	**	DUAL
39	***	*	DUAL
40	n.s.	**	
41	n.s.	*	
42	n.s.	*	
43	n.s.	*	
44	n.s.	n.s.	
45	n.s.	**	
46	n.s.	*	

5.4. Conclusiones parciales

- La gramina y algunos de sus derivados disminuyen la entrada de Ca^{2+} al interior celular, medido mediante la sonda fluorescente Fluo-4, presumiblemente a través de un bloqueo de los CCDV, en base a los resultados obtenidos mediante técnicas de *patch-clamp*.
- Concretamente, el compuesto **18** actúa sobre los CCDV de los subtipos N y P/Q.
- La gramina y algunos de sus derivados son capaces de mantener la actividad Ser/Thr fosfatasa, comprometida por la presencia del inhibidor AO.
- Los estudios de *docking* molecular muestran que varios de los sustituyentes introducidos en los nuevos derivados mejoran la afinidad por la enzima PP2A, en comparación con la gramina, en concordancia con los resultados experimentales.
- Un total de 14 compuestos, incluida la gramina, muestran un perfil multidiana, modulando tanto los CCDV como la actividad de las enzimas Ser/Thr fosfatasas.
- Un halógeno (Br o Cl) en posición C5 del indol, así como la *N*-alquilación con los grupos bencilo, butilo y propargilo, son los sustituyentes óptimos para la obtención de derivados con perfil multidiana.

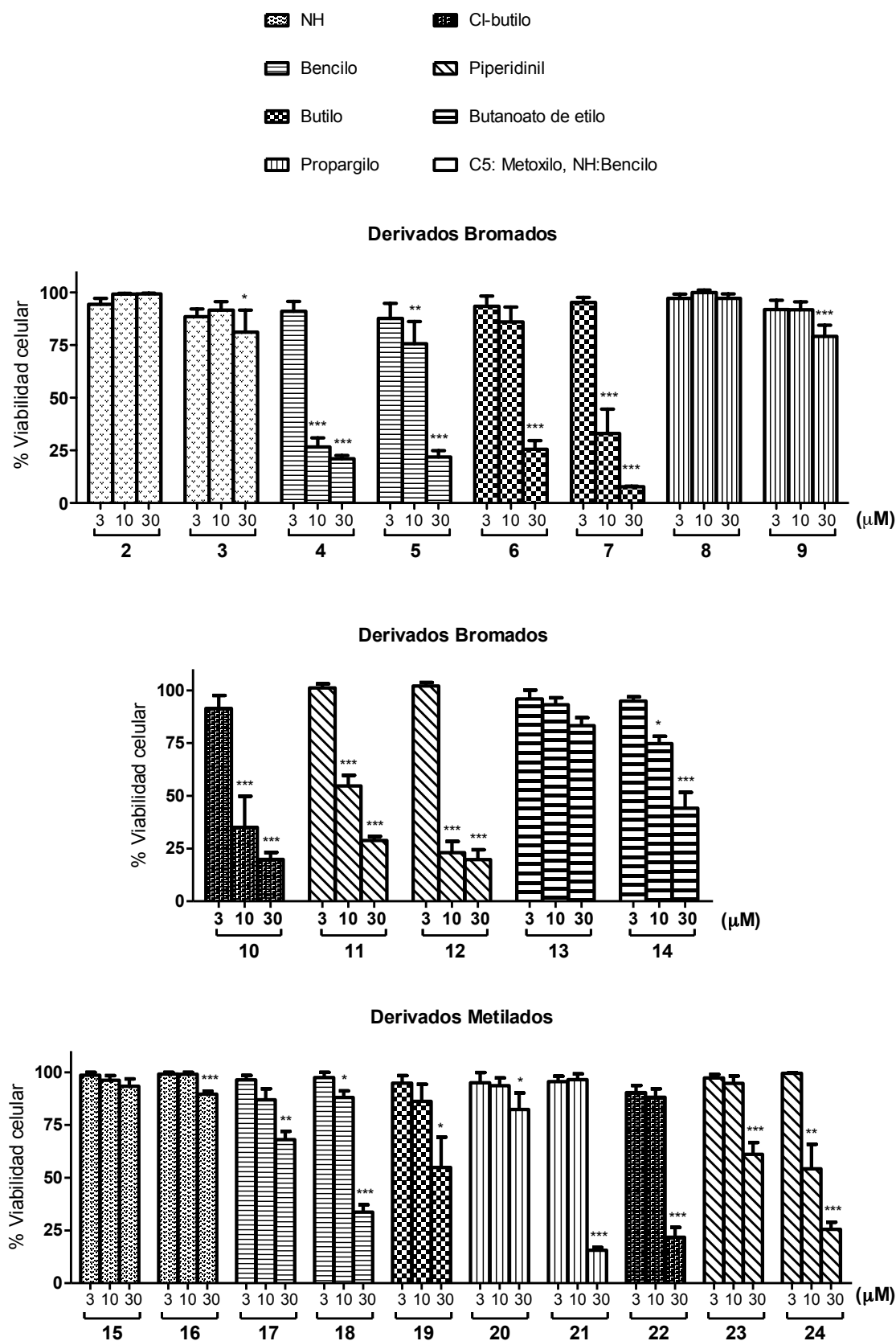
6. EVALUACIÓN DEL PERFIL NEUROPROTECTOR

Una vez confirmada la actividad dual de la gramina y de algunos de sus derivados sobre la homeostasis del Ca^{2+} y las Ser/Thr fosfatasas, la siguiente cuestión que se plantea es si dicha actividad multidiana es capaz de proteger a las neuronas frente a estímulos tóxicos relacionados con la EA, para así confirmar su potencial indicación para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. En primer lugar, se evaluó la toxicidad *per se* de los derivados de gramina en los modelos celulares objeto de estudio, es decir, la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y y las neuronas de corteza motora de cultivo primario de embriones de rata. A continuación, se estudió su perfil neuroprotector en modelos *in vitro* de sobrecarga de Ca^{2+} , de hiperfosforilación de la proteína tau y de estrés oxidativo. Tanto la toxicidad *per se* como el estudio de su perfil neuroprotector se monitorizaron mediante la medida de la viabilidad celular por el método de la reducción del MTT. Además, se determinó el efecto de los compuestos sobre la expresión de tau fosforilada mediante la técnica de *western blot*.

6.1. *Toxicidad per se de los derivados de gramina*

Análogamente al estudio realizado con la gramina (apartado VIII. 1.2.), se evaluó la toxicidad de sus derivados en los dos modelos neuronales *in vitro* empleados en esta Memoria de Tesis. Como se muestra en la Figura 72, ninguno de los derivados, incubados durante 48 h, redujeron la viabilidad de las células SH-SY5Y a concentraciones menores de 10 μM . En general, los derivados que carecen de sustituyente sobre el nitrógeno indólico o que presentan el grupo propargilo son los de menor toxicidad, en contraposición a los derivados con sustituyentes voluminosos que provocan una pérdida de viabilidad mayor de 50 % a la concentración de 10 μM . No existen diferencias entre los derivados con dimetilamina y con piperidina. En relación al sustituyente en posición 5, la familia de *Derivados Bromados* son los que inducen una mayor pérdida de viabilidad celular, siendo los *Derivados no sustituidos* y los *Derivados Piridínicos* los de menor toxicidad. El intercambio del bromo por un átomo de cloro deriva en una notable disminución de la toxicidad celular, como se puede observar, por ejemplo, con los derivados bromados **4** y **5**, que a 10 μM provocan una pérdida de viabilidad celular del 75 y 25 %, respectivamente, pero cuyos análogos clorados **33** y **34** no superan el 15 % de mortalidad. Aun más llamativo es el caso del derivado **7** (75 % de mortalidad a 10 μM), pues al reemplazarse el bromo de su estructura por un átomo de cloro (derivado **36**) no presenta ninguna toxicidad celular, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas con el grupo de células no tratado con compuestos (basal). También la sustitución de bromo por el grupo metoxilo en los *Derivados Piridínicos* conlleva una disminución de la toxicidad celular,

que pasa del 30 % (derivados **39** y **40**) a menos de un 10 % (derivados **45** y **46**), a la concentración de 30 μ M.



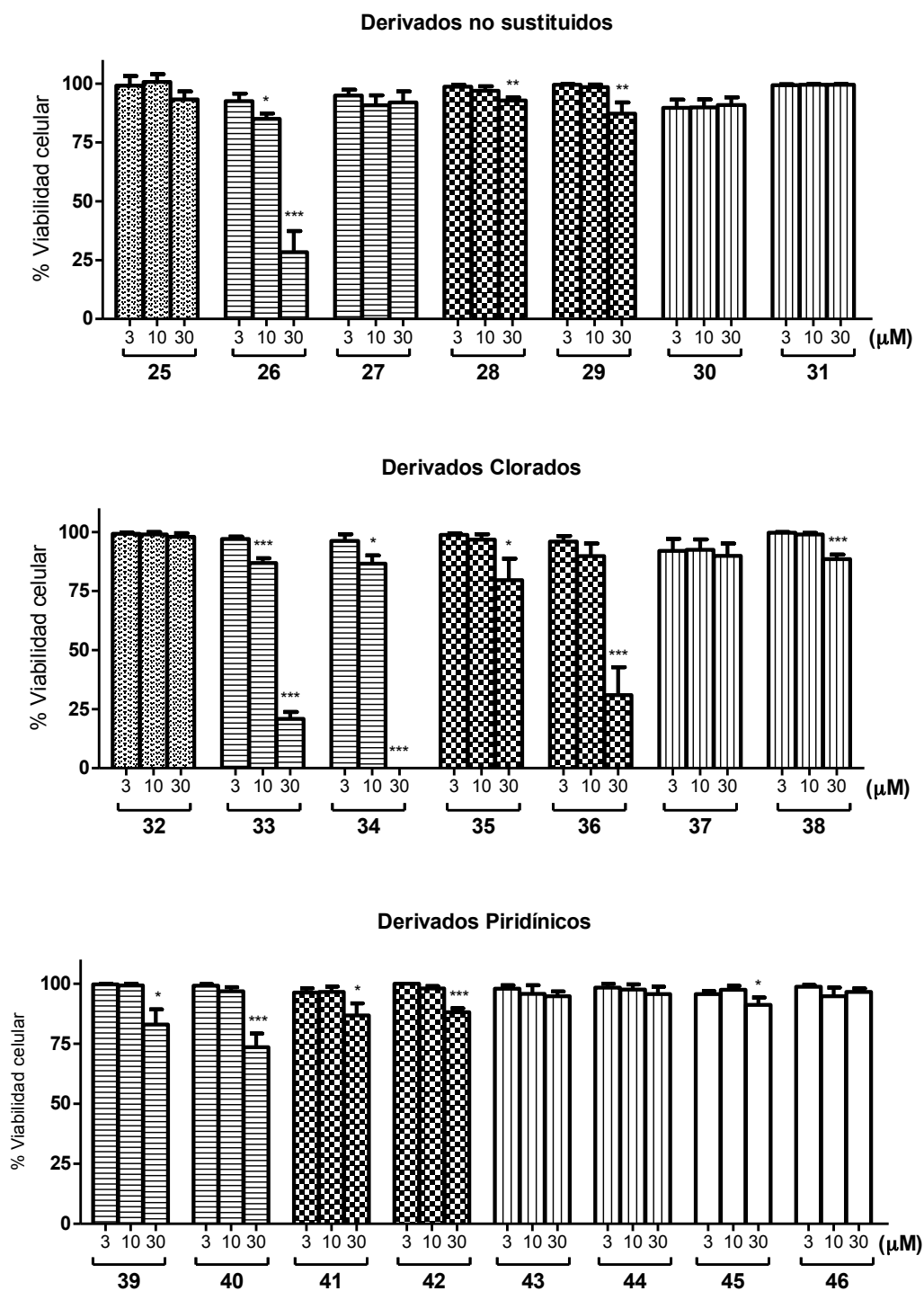


Figura 72. Toxicidad *per se* de los derivados de gramina en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Tras 48 h de incubación de las células con los derivados a las concentraciones de 3, 10 y 30 μM , se midió la viabilidad celular por el método de la reducción del MTT. Los datos se expresan como la media \pm error estándar de al menos 4 experimentos, normalizados frente a la viabilidad celular registrada en ausencia de los compuestos. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

Hasta el momento, solo se ha podido evaluar la toxicidad de las familias de *Derivados Bromados* y *Derivados Metilados* sobre neuronas de corteza motora (Figura 73). Únicamente el derivado bromado **12** redujo la viabilidad celular cuando se incubó durante 48 h a la concentración de 1 μ M. No obstante, a 0,1 μ M (concentración de los compuestos empleada en los experimentos) dicho compuesto no redujo la viabilidad celular. Las mismas relaciones estructura-actividad que sobre las células SH-SY5Y pueden ser inferidas, siendo la familia de *Derivados Bromados* y los sustituyentes voluminosos sobre el nitrógeno indólico los que mayor toxicidad celular provocan.

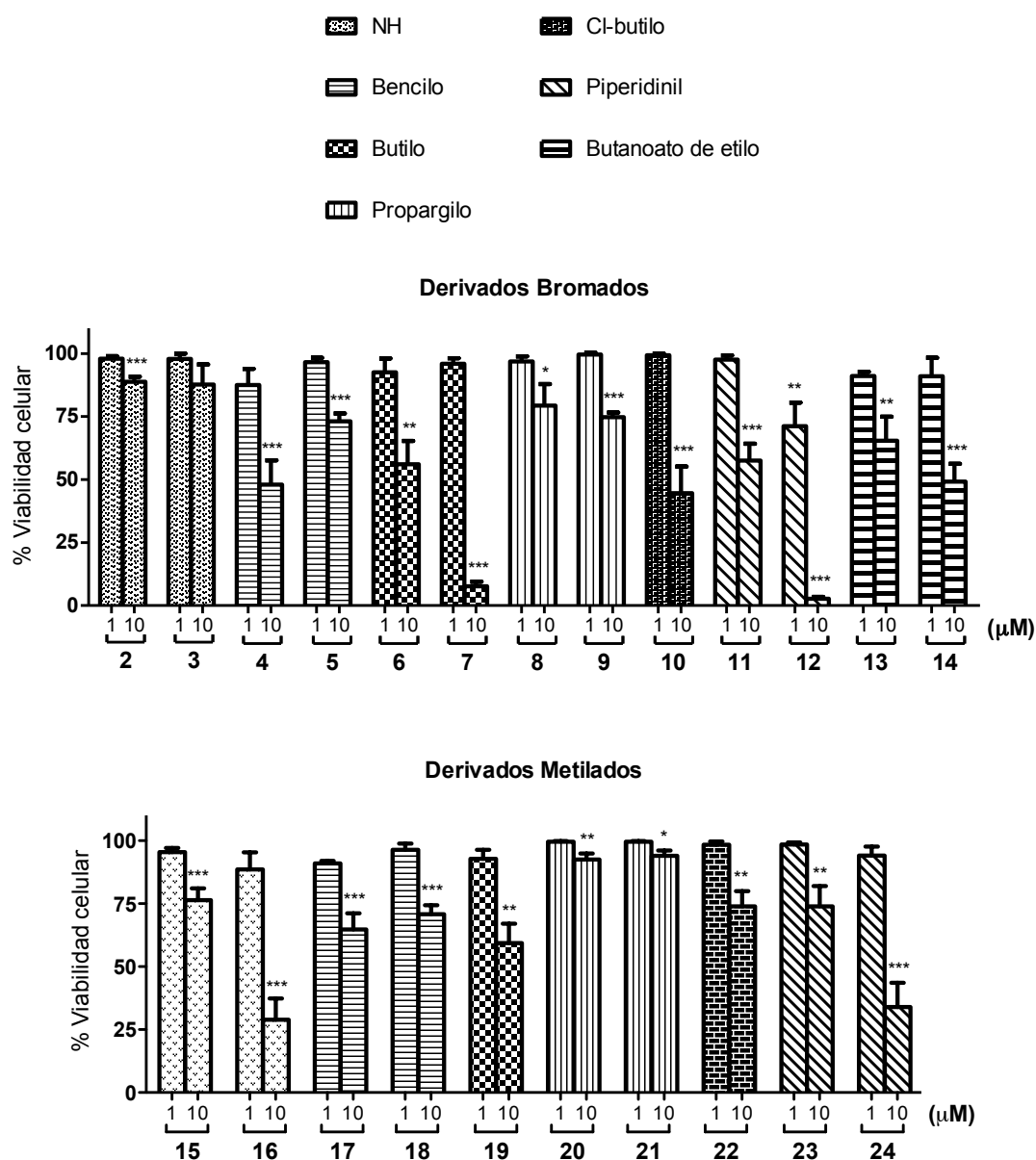


Figura 73. Toxicidad per se de los Derivados Bromados y los Derivados Metilados en neuronas de corteza motora de cultivo primario de embriones de rata. Tras 48 h de incubación de las células con los derivados a las concentraciones de 1 y 10 μ M, se midió la viabilidad celular por el método de la reducción del MTT. Los datos se expresan como la media \pm error estándar de al menos 4 experimentos,

normalizados frente a la viabilidad celular registrada en ausencia de los compuestos. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

En resumen, si bien la gramina no mostró ninguna toxicidad neuronal hasta concentraciones de 30 y 10 μM en células SH-SY5Y y en neuronas corticales, respectivamente, algunos de sus derivados sí han producido una pérdida de viabilidad a concentraciones de 10 y 1 μM , respectivamente. Las concentraciones a las cuales se emplearon los derivados de gramina en los experimentos de neuroprotección siempre fueron, como mínimo, 10 veces inferiores a las concentraciones en la que se observó toxicidad.

6.2. *Modelo de sobrecarga de Ca^{2+} inducido por veratridina en neuronas de corteza motora de rata*

Con el fin de evaluar la capacidad neuroprotectora de la gramina y sus derivados frente a una sobrecarga de Ca^{2+} , las neuronas de corteza motora se expusieron a la veratridina, un ligando de canales de Na^+ dependientes de voltaje (CNDV) que retrasa su inactivación, conduciendo a la despolarización celular y la consiguiente entrada de Ca^{2+} [319]. En primer lugar, se evaluó la gramina en un amplio rango de concentraciones (1 nM- 10 μM), por tratarse del compuesto *hit* y para establecer la concentración a la cual evaluar el resto de los compuestos. Tras 24 h de preincubación de la gramina, las neuronas se coincubaron con la veratridina a 20 μM , lo que indujo una pérdida de viabilidad de alrededor del 45 %. El bloqueador de CNDV tetrodotoxina (TTX) se utilizó como estándar en estos experimentos, a la concentración de 0,1 μM [320]. Sorprendentemente, la gramina no fue capaz de proteger al cultivo neuronal a ninguna de las concentraciones ensayadas (Figura 74), a pesar de haber mostrado un bloqueo de los CCDV en ccb y una reducción del $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_c$ en las células SH-SY5Y.

Pese a la falta de actividad de la gramina en este modelo, se cribaron las familias de *Derivados Bromados*, *Derivados Metilados* y el derivado **25** (análogo de la gramina con piperidina), a la concentración de 1 μM . Como se muestra en la Tabla 9, los derivados poseen propiedades farmacológicas adicionales al compuesto *hit* gramina, ya que más de la mitad de los compuestos redujeron el daño inducido por la veratridina de una manera estadísticamente significativa, destacando los derivados **7** (72 % protección), **18** (51 % protección) y **19** (60 % protección). En estos experimentos, de manera análoga a lo observado durante el estudio de la actividad de los compuestos sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, tanto la presencia de una piperidina en C3, como los grupos bencilo y butilo sobre el nitrógeno indólico, favorecen la actividad neuroprotectora. No se puede olvidar que de los ocho compuestos evaluados mediante técnicas de *patch-clamp*, los derivados

7 y 18 bloquearon ligeramente la I_{Na} , lo cual contribuye a los excelentes datos de neuroprotección registrados con ambos compuestos en este modelo (72 y 51 % de protección, respectivamente).

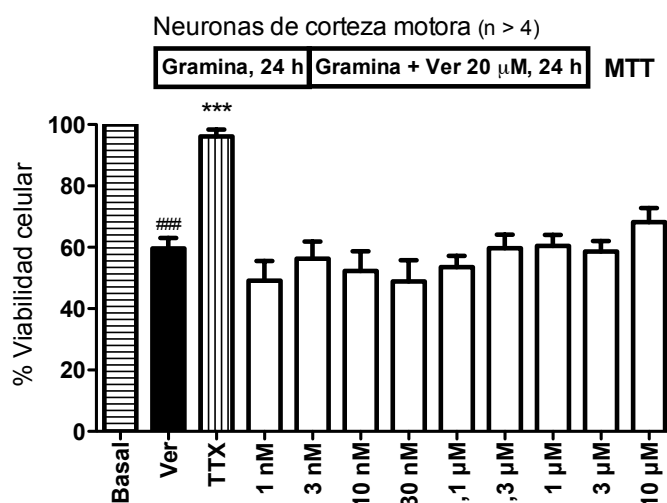
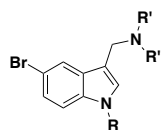
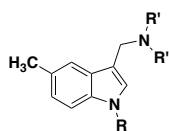


Figura 74. Efecto de la gramina frente a la sobrecarga de Ca^{2+} inducida por veratridina. Los datos se expresan como la media \pm error estándar de al menos 4 experimentos, normalizados frente a la viabilidad celular registrada en ausencia de los compuestos. ### $p < 0,001$, frente a la situación basal y *** $p < 0,001$, frente a la veratridina en ausencia de compuestos.



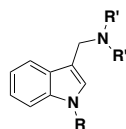
Derivados Bromados	R	R'	% Protección
TTX	-	-	77 \pm 1 ***
2	H	CH ₃	11 \pm 5 ^{n.s.}
3	H	-(CH ₂) ₅ -	19 \pm 3 *
4	Bn	CH ₃	34 \pm 3 ***
5	Bn	-(CH ₂) ₅ -	36 \pm 6 **
6	<i>n</i> -Bu	CH ₃	34 \pm 5 **
7	<i>n</i> -Bu	-(CH ₂) ₅ -	72 \pm 7 ***
8	CH ₂ C \equiv CH	CH ₃	17 \pm 5 ^{n.s.}
9	CH ₂ C \equiv CH	-(CH ₂) ₅ -	24 \pm 4 *
10	-(CH ₂) ₄ Cl	-(CH ₂) ₅ -	39 \pm 6 *
11	-(CH ₂) ₄ Pi	CH ₃	21 \pm 9 ^{n.s.}
12	-(CH ₂) ₄ Pi	-(CH ₂) ₅ -	0 \pm 5 ^{n.s.}
13	-(CH ₂) ₃ CO ₂ Et	CH ₃	42 \pm 6 *
14	-(CH ₂) ₃ CO ₂ Et	-(CH ₂) ₅ -	36 \pm 7 *

*Pi= piperidinil



Derivados Metilados	R	R'	% Protección
TTX	-	-	77 ± 1 ^{***}
15	H	CH ₃	30 ± 5 [*]
16	H	-(CH ₂) ₅ -	7 ± 3 ^{n.s.}
17	Bn	CH ₃	35 ± 9 [*]
18	Bn	-(CH ₂) ₅ -	51 ± 6 ^{**}
19	<i>n</i> -Bu	-(CH ₂) ₅ -	60 ± 7 ^{***}
20	CH ₂ C≡CH	CH ₃	14 ± 10 ^{n.s.}
21	CH ₂ C≡CH	-(CH ₂) ₅ -	19 ± 5 ^{n.s.}
22	-(CH ₂) ₄ Cl	-(CH ₂) ₅ -	36 ± 5 ^{**}
23	-(CH ₂) ₄ Pi	CH ₃	4 ± 6 ^{n.s.}
24	-(CH ₂) ₄ Pi	-(CH ₂) ₅ -	1 ± 5 ^{n.s.}

*Pi= piperidinil



Derivados no sustituidos	R	R'	% Protección
TTX	-	-	77 ± 1 ^{***}
Gramina (1)	H	CH ₃	0 ± 4 ^{n.s.}
25	H	-(CH ₂) ₅ -	18 ± 7 ^{n.s.}

Tabla 9. Efecto neuroprotector de la gramina y algunos de sus derivados frente a la sobrecarga de Ca²⁺ inducida por veratridina en neuronas de corteza motora. Tras 24 h de preincubación de los compuestos, las neuronas se incubaron con la veratridina 20 μM y los compuestos durante 24 h. La viabilidad celular se midió por el método de la reducción del MTT y el % de protección se calculó tal y como se ha explicado en el apartado VII. 2. 2.4. Los datos se expresan como la media ± error estándar de al menos 4 experimentos. Los compuestos se evaluaron a la concentración de 1 μM, exceptuando el compuesto **12** que debido a su toxicidad se utilizó a 0,1 μM. La TTX se utilizó a 0,1 μM. ****p* < 0,001, ***p* < 0,01, **p* < 0,05 y n.s. = no significativo.

Corroborando nuestra hipótesis, aquellos derivados de gramina con mejor bloqueo de los CCDV (**5**, **7**, **18** y **19**, Figura 62) o mayor reducción del Δ[Ca²⁺]_c (**10** y **22**, Figura 60) también ofrecen unos destacados valores de neuroprotección en este modelo de sobrecarga de Ca²⁺ (Figura 75). El derivado bromado **13** (42 % protección), que no mostró ninguna actividad sobre

la homeostasis del Ca^{2+} en los experimentos realizados, podría estar actuando por otros mecanismos de acción desconocidos. Por último, cabe destacar que todos los compuestos clasificados como multidiana (**4**, **5**, **7**, **9** y **18**, Tabla 8) muestran valores de neuroprotección estadísticamente significativos, con la excepción de la gramina y su derivado con piperidina **25**.

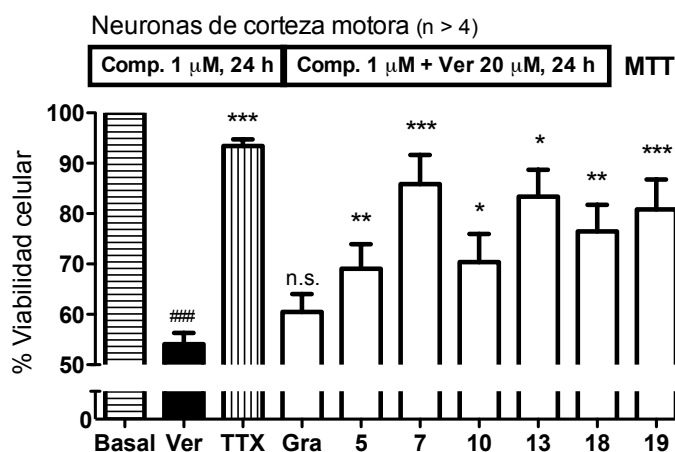


Figura 75. Representación gráfica de los compuestos con mejor actividad neuroprotectora en el modelo de sobrecarga de Ca^{2+} inducida por veratridina. Los datos se expresan como la media \pm error estándar de al menos 4 experimentos, normalizados frente a la viabilidad celular en ausencia de los compuestos. ### $p < 0,001$, frente a la situación basal. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ y * $p < 0,05$, frente a las células tratadas con veratridina en ausencia de los compuestos. Ver = veratridina. Gra = gramina.

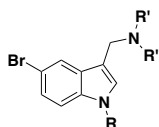
6.3. Modelo de hiperfosforilación de tau inducido por ácido okadaico en células SH-SY5Y

Aplicando el mismo protocolo utilizado para el compuesto *hit* gramina (apartado VIII. 1. 1.2.), sus derivados se evaluaron a la concentración de 0,1 μM frente a la toxicidad inducida por el AO a 20 nM durante 20 h (Tabla 10). Así, 43 de los 46 compuestos testados mostraron valores de neuroprotección estadísticamente significativos, superando en muchos casos los valores de protección observados con los controles memantina y melatonina (63 y 43 % protección, respectivamente) ^[109] ^[111]. Al igual que ocurría con la gramina, los derivados **33**, **35**, **36**, **39** y **42** sobresalen por anular el daño causado por el AO, hasta alcanzar condiciones basales (protección > 90 %) (Figura 76).

A excepción del compuesto **20**, todos los derivados que mostraron capacidad para mantener la actividad Ser/Thr fosfatasa ejercieron un efecto neuroprotector en este modelo de hiperfosforilación de la proteína tau. No obstante, no solo aquellos derivados con buenos resultados sobre la actividad fosfatasa (por ejemplo, derivados **26**, **30**, **33**, **36**, **38** y **46**) mostraron efecto neuroprotector, sino que también compuestos como por ejemplo el **28**, **31** o **34**,

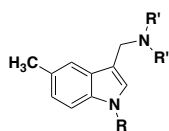
que no mostraron capacidad para mantener la actividad fosfatasa, fueron capaces de disminuir la mortalidad inducida por el AO, por lo que otros mecanismos de acción podrían estar contribuyendo.

Corroborando las relaciones estructura-actividad inferidas de los resultados sobre la actividad fosfatasa, las mejores familias de compuestos en este modelo de neurodegeneración vuelven a ser los *Derivados Clorados*, *Derivados no sustituidos* y *Derivados Piridínicos*, siendo los más óptimos los que soportan sobre el nitrógeno indólico los grupos bencilo y butilo. Las familias de *Derivados Bromados* y *Derivados Metilados* son las que menores porcentajes de neuroprotección ejercen, perteneciendo a ellas precisamente los únicos derivados que no mostraron efecto neuroprotector en este modelo (**8**, **20** y **21**). Si bien estos tres compuestos tienen en común el sustituyente propargilo, otros derivados con ese mismo sustituyente (**9**, **30**, **31**, **37**, **38**, **43** y **44**) sí protegieron frente al AO.



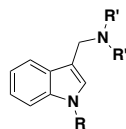
<i>Derivados Bromados</i>	R	R'	% Protección
Melatonina	-	-	43 ± 3 ^{***}
Memantina	-	-	63 ± 2 ^{***}
2	H	CH ₃	47 ± 4 ^{**}
3	H	-(CH ₂) ₅ -	60 ± 5 ^{**}
4	Bn	CH ₃	56 ± 3 ^{***}
5	Bn	-(CH ₂) ₅ -	54 ± 6 ^{**}
6	<i>n</i> -Bu	CH ₃	66 ± 5 ^{**}
7	<i>n</i> -Bu	-(CH ₂) ₅ -	71 ± 3 ^{***}
8	CH ₂ C≡CH	CH ₃	12 ± 4 ^{n.s.}
9	CH ₂ C≡CH	-(CH ₂) ₅ -	47 ± 3 ^{**}
10	-(CH ₂) ₄ Cl	-(CH ₂) ₅ -	48 ± 8 [*]
11	-(CH ₂) ₄ Pi	CH ₃	31 ± 3 ^{**}
12	-(CH ₂) ₄ Pi	-(CH ₂) ₅ -	61 ± 4 ^{***}
13	-(CH ₂) ₃ CO ₂ Et	CH ₃	58 ± 2 ^{**}
14	-(CH ₂) ₃ CO ₂ Et	-(CH ₂) ₅ -	43 ± 5 [*]

*Pi= piperidinil

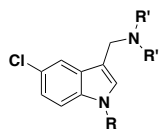


<i>Derivados Metilados</i>	R	R'	% Protección
Melatonina	-	-	43 ± 3 ^{***}
Memantina	-	-	63 ± 2 ^{***}
15	H	CH ₃	59 ± 4 ^{**}
16	H	-(CH ₂) ₅ -	38 ± 3 ^{***}
17	Bn	CH ₃	44 ± 4 [*]
18	Bn	-(CH ₂) ₅ -	56 ± 5 ^{**}
19	<i>n</i> -Bu	-(CH ₂) ₅ -	46 ± 5 [*]
20	CH ₂ C≡CH	CH ₃	12 ± 3 ^{n.s.}
21	CH ₂ C≡CH	-(CH ₂) ₅ -	42 ± 8 ^{n.s.}
22	-(CH ₂) ₄ Cl	-(CH ₂) ₅ -	56 ± 6 [*]
23	-(CH ₂) ₄ Pi	CH ₃	37 ± 1 ^{***}
24	-(CH ₂) ₄ Pi	-(CH ₂) ₅ -	26 ± 3 ^{**}

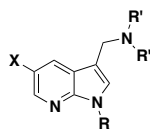
*Pi= piperidinil



<i>Derivados no sustituidos</i>	R	R'	% Protección
Melatonina	-	-	43 ± 3 ^{***}
Memantina	-	-	63 ± 2 ^{***}
Gramina (1)	H	CH ₃	45 ± 2 ^{***}
25	H	-(CH ₂) ₅ -	47 ± 5 ^{**}
26	Bn	CH ₃	65 ± 3 ^{***}
27	Bn	-(CH ₂) ₅ -	64 ± 4 ^{***}
28	<i>n</i> -Bu	CH ₃	50 ± 3 ^{***}
29	<i>n</i> -Bu	-(CH ₂) ₅ -	55 ± 4 ^{***}
30	CH ₂ C≡CH	CH ₃	74 ± 2 ^{***}
31	CH ₂ C≡CH	-(CH ₂) ₅ -	58 ± 5 ^{***}



<i>Derivados Clorados</i>	R	R'	% Protección
Melatonina	-	-	43 ± 3 ^{***}
Memantina	-	-	63 ± 2 ^{***}
32	H	-(CH ₂) ₅ -	62 ± 4 ^{***}
33	Bn	CH ₃	88 ± 2 ^{***}
34	Bn	-(CH ₂) ₅ -	59 ± 4 ^{***}
35	<i>n</i> -Bu	CH ₃	93 ± 1 ^{***}
36	<i>n</i> -Bu	-(CH ₂) ₅ -	98 ± 1 ^{***}
37	CH ₂ C≡CH	CH ₃	43 ± 6 ^{**}
38	CH ₂ C≡CH	-(CH ₂) ₅ -	55 ± 7 [*]



<i>Derivados Piridínicos</i>	X	R	R'	% Protección
Melatonina	-	-	-	43 ± 3 ^{***}
Memantina	-	-	-	63 ± 2 ^{***}
39	Br	Bn	CH ₃	84 ± 2 ^{***}
40	Br	Bn	-(CH ₂) ₅ -	57 ± 4 ^{***}
41	Br	<i>n</i> -Bu	CH ₃	55 ± 4 ^{***}
42	Br	<i>n</i> -Bu	-(CH ₂) ₅ -	98 ± 1 ^{***}
43	Br	CH ₂ C≡CH	CH ₃	63 ± 5 ^{**}
44	Br	CH ₂ C≡CH	-(CH ₂) ₅ -	68 ± 3 ^{***}
45	CH ₃ O	Bn	CH ₃	51 ± 5 ^{***}
46	CH ₃ O	Bn	-(CH ₂) ₅ -	62 ± 2 ^{***}

Tabla 10. Efecto neuroprotector de los derivados de gramina frente a la hiperfosforilación de la proteína tau inducida por ácido okadaico en células SH-SY5Y. Tras 24 h de preincubación de los compuestos, las células SH-SY5Y se coincuraron con el AO 20 nM y los compuestos durante 20 h. La viabilidad celular se midió por el método de la reducción del MTT y el % de protección se calculó tal y como se ha explicado en el apartado VII. 2. 2.4. Los datos se expresan como la media ± error estándar de al menos 5 experimentos. Los compuestos se evaluaron a la concentración de 0,1 μM, la melatonina a 30 nM y la memantina a 10 nM. ^{***} $p < 0,001$, ^{**} $p < 0,01$, ^{*} $p < 0,05$, n.s.= no significativo.

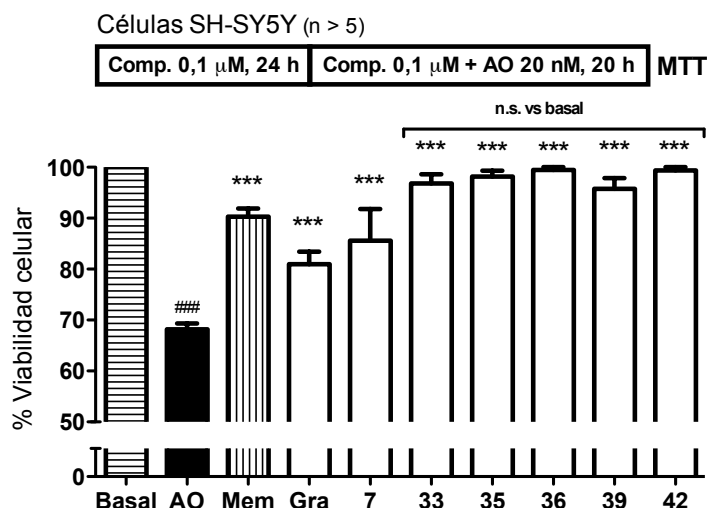


Figura 76. Representación gráfica de los compuestos con mejor actividad neuroprotectora en el modelo de hiperfosforilación de tau inducida por AO. Los datos se expresan como la media \pm error estándar de al menos 5 experimentos, normalizados frente a la viabilidad celular en ausencia de los compuestos. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ y * $p < 0,05$. Mem = memantina. Gra = gramina.

6.4. Efecto de la gramina y algunos derivados sobre la expresión de tau hiperfosforilada

Como se ha mencionado, el tratamiento de las células SH-SY5Y con el AO 20 nM durante 20 h constituye un buen modelo para remedar la neurodegeneración observada en la EA, ya que conduce a la hiperfosforilación de la proteína tau y, en último término, a la muerte neuronal. El modelo del apartado anterior permite estudiar el efecto de la gramina y sus derivados sobre la pérdida de viabilidad celular causada por el AO, medido por el método de la reducción del MTT. No obstante, es también de interés cuantificar la expresión de la proteína tau hiperfosforilada, con el fin de determinar si los compuestos son capaces de reducirla. Así, la gramina y los derivados **2**, **4**, **6**, **7** y **18** (aquellos capaces de mantener la actividad fosfatasa y con mejores valores de neuroprotección en el momento en el que se realizaron estos experimentos) se seleccionaron para su estudio mediante la técnica de *western blot*. Para ello, se utilizó el anticuerpo primario anti-fosfotau AT8, capaz de reconocer a los fosfoepítotos *p*Ser202 y *p*Thr205, característicos de la proteína tau que conforma los ovillos neurofibrilares [321]. Además, ambos aminoácidos son claves para la agregación de tau en pacientes con la EA y son desfosforilados eficientemente por la fosfatasa PP2A [83]. En la Figura 77 se puede observar cómo la gramina, así como los derivados **4**, **7** y **18** son capaces de disminuir la hiperfosforilación de la proteína tau, confirmando su potencial indicación para el tratamiento de la EA. Cabe destacar la capacidad de la gramina y los derivados **4** y **18** para mantener los

niveles de fosforilación en condiciones basales, no mostrando diferencias estadísticamente significativas con las muestras sin tratamiento con AO.

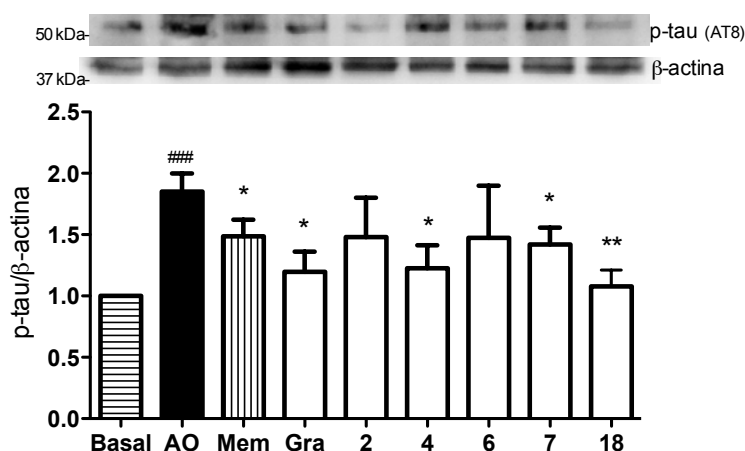
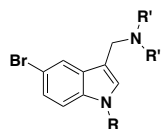


Figura 77. Disminución de la hiperfosforilación de tau, inducida por AO, de la gramina y sus derivados. Tras 24 h de preincubación de los compuestos, las células SH-SY5Y se coincubaron con el AO 20 nM y los compuestos durante 20 h. Arriba, *immunoblot* de un experimento representativo. Abajo, análisis cuantitativo de la hiperfosforilación de tau. La densidad relativa de las bandas se calculó como el cociente entre la densidad de la proteína tau fosforilada y su correspondiente banda de β-actina, el control de carga. Las barras representan la media ± error estándar de al menos 4 experimentos. Los compuestos se evaluaron a la concentración de 0,1 μM y la memantina a 10 nM. ### $p < 0,001$, respecto a la situación basal. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,05$, respecto a la situación control de células tratadas con AO en ausencia de los compuestos. No existen diferencias significativas entre los pocillos sin tratamiento y los pocillos con AO más gramina, derivado 4 y derivado 18.

6.5. Modelo de estrés oxidativo inducido por rotenona/oligomicina A en células SH-SY5Y

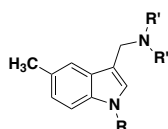
Debido a la importancia que el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial tienen en la etiopatogenia de la EA, también se evaluó el efecto de los derivados de gramina sobre el daño producido por el cóctel R/O en células SH-SY5Y. Teniendo en cuenta que la gramina presentó propiedades neuroprotectoras frente a este modelo a las concentraciones comprendidas entre 10 nM y 0,3 μM, se decidió utilizar la concentración de 10 nM para la evaluación de sus derivados. En la Tabla 11 se puede observar cómo las familias de *Derivados Bromados* y *Derivados Metilados* son las que peores resultados ofrecen, en ningún caso superando el 26 % de protección. Por el contrario, las familias de *Derivados no sustituidos* y *Derivados Piridínicos* alcanzan el 40 % de neuroprotección, equiparándose al compuesto *hit* gramina y al control melatonina (por ejemplo los derivados 25, 31 o 46) (Figura 78). No obstante, en base a estos

resultados obtenidos, no es posible inferir relaciones estructura-actividad puesto que no se observa ningún patrón.



<i>Derivados Bromados</i>	R	R'	% Protección
Melatonina	-	-	$36 \pm 5^*$
2	H	CH ₃	$16 \pm 3^{n.s.}$
3	H	-(CH ₂) ₅ -	$10 \pm 3^{n.s.}$
4	Bn	CH ₃	$2 \pm 3^{n.s.}$
5	Bn	-(CH ₂) ₅ -	$0 \pm 3^{n.s.}$
6	<i>n</i> -Bu	CH ₃	$3 \pm 3^{n.s.}$
7	<i>n</i> -Bu	-(CH ₂) ₅ -	$8 \pm 3^{n.s.}$
8	CH ₂ C≡CH	CH ₃	$21 \pm 3^*$
9	CH ₂ C≡CH	-(CH ₂) ₅ -	$21 \pm 3^*$
10	-(CH ₂) ₄ Cl	-(CH ₂) ₅ -	$16 \pm 3^{n.s.}$
11	-(CH ₂) ₄ Pi	CH ₃	$13 \pm 3^{n.s.}$
12	-(CH ₂) ₄ Pi	-(CH ₂) ₅ -	$10 \pm 3^{n.s.}$
13	-(CH ₂) ₃ CO ₂ Et	CH ₃	$11 \pm 3^{n.s.}$
14	-(CH ₂) ₃ CO ₂ Et	-(CH ₂) ₅ -	$10 \pm 4^{n.s.}$

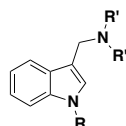
*Pi= piperidinil



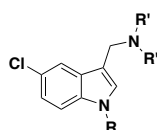
<i>Derivados Metilados</i>	R	R'	% Protección
Melatonina	-	-	$36 \pm 5^*$
15	H	CH ₃	$26 \pm 3^*$
16	H	-(CH ₂) ₅ -	$23 \pm 4^*$
17	Bn	CH ₃	$21 \pm 5^{n.s.}$
18	Bn	-(CH ₂) ₅ -	$10 \pm 3^{n.s.}$
19	<i>n</i> -Bu	-(CH ₂) ₅ -	$7 \pm 4^{n.s.}$

20	CH ₂ C≡CH	CH ₃	22 ± 1 [*]
21	CH ₂ C≡CH	-(CH ₂) ₅ -	7 ± 4 ^{n.s.}
22	-(CH ₂) ₄ Cl	-(CH ₂) ₅ -	19 ± 3 ^{n.s.}
23	-(CH ₂) ₄ Pi	CH ₃	23 ± 3 [*]
24	-(CH ₂) ₄ Pi	-(CH ₂) ₅ -	24 ± 3 [*]

*Pi= piperidinil



<i>Derivados no sustituidos</i>	R	R'	% Protección
Melatonina	-	-	36 ± 5 [*]
Gramina (1)	H	CH ₃	30 ± 5 [*]
25	H	-(CH ₂) ₅ -	40 ± 5 [*]
26	Bn	CH ₃	31 ± 3 ^{***}
27	Bn	-(CH ₂) ₅ -	26 ± 2 ^{***}
28	<i>n</i> -Bu	CH ₃	20 ± 6 ^{n.s.}
29	<i>n</i> -Bu	-(CH ₂) ₅ -	25 ± 5 ^{**}
30	CH ₂ C≡CH	CH ₃	28 ± 4 ^{***}
31	CH ₂ C≡CH	-(CH ₂) ₅ -	41 ± 3 ^{***}



<i>Derivados Clorados</i>	R	R'	% Protección
Melatonina	-	-	36 ± 5 [*]
32	H	-(CH ₂) ₅ -	21 ± 3 ^{**}
33	Bn	CH ₃	32 ± 3 [*]
34	Bn	-(CH ₂) ₅ -	22 ± 2 ^{**}
35	<i>n</i> -Bu	CH ₃	38 ± 3 [*]
36	<i>n</i> -Bu	-(CH ₂) ₅ -	27 ± 5 ^{n.s.}
37	CH ₂ C≡CH	CH ₃	26 ± 6 [*]

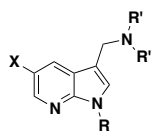
	38	$\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$	$-(\text{CH}_2)_5-$	$16 \pm 2^{\text{n.s.}}$
				
Derivados Piridínicos	X	R	R'	% Protección
Melatonina	-	-	-	$36 \pm 5^*$
39	Br	Bn	CH_3	$32 \pm 4^*$
40	Br	Bn	$-(\text{CH}_2)_5-$	$23 \pm 3^{**}$
41	Br	<i>n</i> -Bu	CH_3	$16 \pm 3^{\text{n.s.}}$
42	Br	<i>n</i> -Bu	$-(\text{CH}_2)_5-$	$39 \pm 3^*$
43	Br	$\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$	CH_3	$17 \pm 3^{\text{n.s.}}$
44	Br	$\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$	$-(\text{CH}_2)_5-$	$13 \pm 3^{\text{n.s.}}$
45	CH_3O	Bn	CH_3	$29 \pm 6^*$
46	CH_3O	Bn	$-(\text{CH}_2)_5-$	$40 \pm 6^{**}$

Tabla 11. Efecto neuroprotector de los derivados de gramina frente al estrés oxidativo inducido por R/O en células SH-SY5Y. Tras 24 h de preincubación de los compuestos, las células SH-SY5Y se coincubaron con R/O, 30 y 10 μM respectivamente, y los compuestos durante 24 h. La viabilidad celular se midió por el método de la reducción del MTT y el % de protección se calculó tal y como se ha explicado en el apartado VII. 2. 2.4. Los datos se expresan como la media \pm error estándar de al menos 5 experimentos. Los compuestos se evaluaron a la concentración de 10 nM y la melatonina a 30 nM. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, n.s.= no significativo.

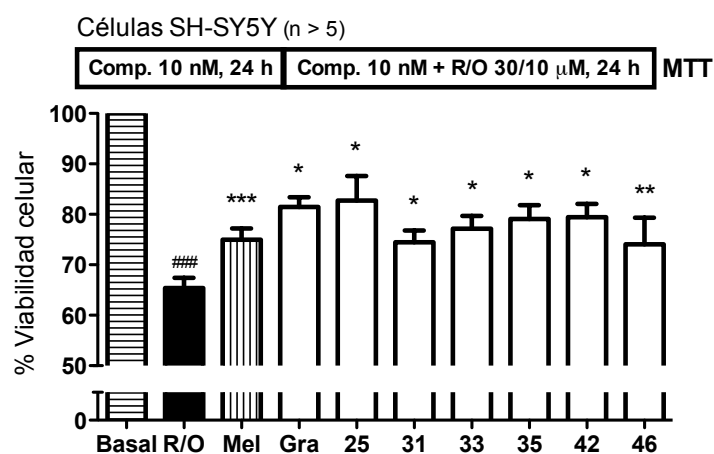


Figura 78. Representación gráfica de los compuestos con mejor actividad neuroprotectora en el modelo de estrés oxidativo inducido por R/O. Los datos se expresan como la media \pm error estándar de al menos 5 experimentos, normalizados frente a la viabilidad celular en ausencia de los compuestos. $^{###}p < 0,001$, respecto a la situación basal. $^{***}p < 0,001$, $^{**}p < 0,01$ y $^{*}p < 0,05$, respecto a las células tratadas con R/O en ausencia de los compuestos. Mel = melatonina. Gra = gramina.

Como se ha mencionado previamente, la actividad antioxidante de los derivados **3** y **25** ya ha sido explorada por Olgen y col., (2011) en un modelo de peroxidación lipídica *in vitro*, en el cual el derivado **25** ofreció un gran efecto antioxidante, al contrario que el derivado **3** que apenas mostró actividad ^[241]. Los resultados obtenidos en nuestro modelo de estrés oxidativo inducido por R/O corroboran dichas observaciones, mostrando el derivado **25** un 40 % de neuroprotección y careciendo de efecto el derivado **3**.

6.6. Modelo de excitotoxicidad inducido por glutamato en rodajas de hipocampo de rata

La exposición de las rodajas de hipocampo de rata al neurotransmisor endógeno glutamato ofrece un modelo de excitotoxicidad que consigue emular la neurodegeneración presente en la EA. La muerte por excitotoxicidad es consecuencia de una excesiva activación de los receptores de glutamato, que conduce a la pérdida de estructuras postsinápticas, como las dendritas y los somas neuronales ^[18]. El origen de esta exposición crónica al glutamato no es exclusivamente neuronal, sino que la glía también tiene un papel muy importante en la recaptación del glutamato ^[18]. Así, las rodajas de hipocampo proporcionan un modelo más fisiológico, ya que en este tipo de preparación coexisten las neuronas y la glía. Hasta el momento, se han podido evaluar únicamente algunos de los compuestos de las familias de *Derivados Bromados* y *Derivados Metilados*, siendo seleccionados en función de su actividad biológica *in vitro* o por diversidad estructural.

Previamente a su evaluación en dicho modelo, se estudió la toxicidad *per se* de los compuestos sobre las rodajas de hipocampo de rata, aunque, por cuestiones éticas de minimizar el número de animales empleados, se hizo únicamente a la concentración de 10 μ M, la misma concentración que la empleada en los experimentos de neuroprotección, y en dos experimentos para cada compuesto ($n = 2$). De los 11 compuestos evaluados, sólo el compuesto **4** redujo la viabilidad celular de manera estadísticamente significativa, quedando descartado para su evaluación en este modelo.

Para inducir la muerte por excitotoxicidad, las rodajas se expusieron a glutamato 1 mM durante 4 h, lo que supuso una reducción de aproximadamente el 30 % de la viabilidad, medido por el método de la reducción del MTT. La melatonina se utilizó como control para estos experimentos por su habilidad para reducir la muerte por excitotoxicidad, mediada por su efecto antioxidante y por atenuar la disminución de la expresión de la subunidad B de PP2A ^[109]. Bajo estas condiciones experimentales, 8 de los 10 compuestos evaluados mostraron un efecto neuroprotector de manera estadísticamente significativa (Figura 79).

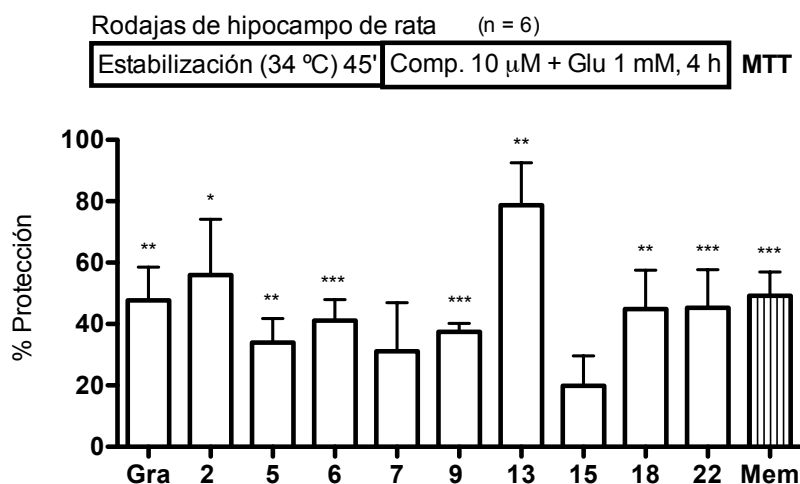


Figura 79. Efecto neuroprotector de la gramina y sus derivados en el modelo de excitotoxicidad inducido por glutamato en rodajas de hipocampo de rata. Los datos se expresan como la media \pm error estándar de al menos 6 experimentos, calculándose el % de protección según lo explicado en el apartado VII. 2. 2.4. Los compuestos y la memantina se evaluaron a la concentración de 10 µM. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$. Mem = memantina, Gra = gramina.

Este modelo experimental es de especial interés para el estudio del perfil neuroprotector de los derivados de gramina objeto de esta Memoria de Tesis puesto que evoca simultáneamente la dishomeostasis del Ca^{2+} y la disminución de la actividad fosfatasa, involucrando así directamente a las dos dianas sobre las que van dirigidos los compuestos. La exposición a glutamato conduce a una sobrecarga de Ca^{2+} mediada por los receptores NMDA e, indirectamente, a través de los CCDV ^[134]. A su vez, la sobreactivación del receptor NMDA provoca la disociación de PP2A y pérdida de su regulación sobre el receptor, lo que favorece una mayor permeabilidad de Ca^{2+} a su través ^[97]. Además, la excitotoxicidad provoca una reducción en la expresión de la subunidad B de PP2A ^[109], inhibiendo su actividad fosfatasa. En este contexto, tanto los compuestos capaces de reducir el $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_c$ (derivado 22), como los que mantienen la actividad fosfatasa (derivados 2 y 6), y en especial los compuestos con actividad dual (gramina y los derivados 5, 18 y 9) ofrecen un buen efecto neuroprotector. Sorprendentemente, el derivado 7, a pesar de su actividad multidiana y sus excelentes resultados

en otros modelos de neurodegeneración, no redujo la mortalidad de las rodajas a la concentración evaluada.

6.7. Conclusiones parciales

- Si bien los derivados presentan mayor toxicidad celular que el compuesto *hit* gramina, las concentraciones a las cuales se observaron los efectos neuroprotectores se encuentran muy alejadas de las concentraciones citotóxicas, por lo que se dispone de una buena ventana terapéutica.
- La capacidad de los compuestos para modular la homeostasis del Ca^{2+} celular conlleva un efecto neuroprotector en el modelo de sobrecarga de Ca^{2+} inducido por veratridina en neuronas de corteza motora, siendo esta una propiedad adicional de los derivados puesto que la gramina carece de ella.
- El mantenimiento de la actividad fosfatasa conduce a una reducción de la mortalidad inducida por AO, medida por el método de la reducción del MTT, así como a una disminución de la hiperfosforilación de la proteína tau, medido por *western blot*.
- Algunos de los derivados de gramina conllevan cierta actividad antioxidante, mostrada en el modelo de estrés oxidativo inducido por R/O en células SH-SY5Y.
- También en el modelo de excitotoxicidad inducida por glutamato en rodajas de hipocampo de rata, la mayoría de los compuestos evaluados muestran un efecto neuroprotector.
- Por tanto, la actividad dual de la gramina y de algunos de sus derivados sobre la homeostasis del Ca^{2+} y las Ser/Thr fosfatasas es capaz de proteger a las neuronas frente a estímulos tóxicos relacionados con la EA, confirmando así su potencial indicación para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

IX. CONCLUSIONS / CONCLUSIONES

IX. CONCLUSIONS

Based on the results of this PhD dissertation, the following **partial conclusions** can be drawn:

- Gramine is a good starting material for the design of derivatives with dual activity on voltage-gated calcium channels and Ser/Thr phosphatase enzymes.
- A total of 44 derivatives were synthesized, in two or three synthetic steps under mild conditions and with high yields in most of the cases. The issue of the low chemical stability of the gramine derivatives has been solved.
- Gramine and some of its derivatives decrease Ca^{2+} entry into SH-SY5Y cells, measured by the Fluo-4 fluorescent probe, presumably through the blockade of the voltage-gated calcium channels, as shown by patch-clamp techniques. Specifically, compound **18** acts on N and P/Q voltage-gated calcium channels subtypes.
- Gramine and some of its derivatives are capable of maintaining the Ser/Thr phosphatase activity, compromised by the presence of the selective inhibitor okadaic acid. Molecular docking studies corroborate the affinity of the compounds for the enzyme PP2A.
- This dual activity of the compounds can protect neurons against toxic stimuli related to Alzheimer's disease, such as tau protein hyperphosphorylation, oxidative stress, Ca^{2+} overload and excitotoxicity, confirming its potential indication for the treatment of neurodegenerative diseases.

Finally, the **general conclusion** is as follows:

- ✓ The overall results of this PhD dissertation allow us to conclude that the multitarget approach of Ca^{2+} homeostasis and Ser/Thr phosphatase activity is a pharmacological strategy with potential indication for the treatment of Alzheimer's disease, being its modulation feasible thanks to the new family of synthesized compounds derivatives of gramine.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados de esta Memoria de Tesis se pueden extraer las siguientes **conclusiones parciales**:

- La gramina es un buen compuesto de partida para el diseño de derivados con actividad dual sobre los CCDV y las enzimas Ser/Thr fosfatasas.
- Se sintetizaron un total de 44 derivados en dos o tres pasos de reacción, en condiciones suaves y con rendimientos altos en la mayoría de los casos. La baja estabilidad química de los derivados de gramina ha quedado solventada.
- La gramina y algunos de sus derivados disminuyen la entrada de Ca^{2+} al interior celular, medido mediante la sonda fluorescente Fluo-4, presumiblemente a través de un bloqueo de los CCDV, en base a los resultados obtenidos mediante técnicas de *patch-clamp*. Concretamente, el compuesto **18** actúa sobre los CCDV de los subtipos N y P/Q.
- La gramina y algunos de sus derivados son capaces de mantener la actividad Ser/Thr fosfatasa, comprometida por la presencia del inhibidor AO. Los estudios de *docking* molecular corroboran la afinidad de los compuestos por la enzima PP2A.
- La actividad dual de los compuestos es capaz de proteger a las neuronas frente a estímulos tóxicos relacionados con la EA, como son la hiperfosforilación de la proteína tau, el estrés oxidativo, la sobrecarga de Ca^{2+} y la excitotoxicidad, confirmando así su potencial indicación para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Para finalizar, la **conclusión general** es la siguiente:

- ✓ Los resultados globales de esta Memoria de Tesis nos permiten concluir que el abordaje multidiana de la homeostasis del Ca^{2+} y la actividad Ser/Thr fosfatasa es una estrategia farmacológica con potencial indicación para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, siendo su abordaje factible gracias a la nueva familia sintetizada de compuestos derivados de gramina.

X. BIBLIOGRAFÍA

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Neuroalianza. *Alianza Española de Enfermedades Neurodegenerativas* 2013 [05/05/2016]. Disponible en: <http://www.neuroalianza.org>.
2. Sheikh S, Safia, Haque E y col. "Neurodegenerative Diseases: Multifactorial Conformational Diseases and Their Therapeutic Interventions". *Journal of neurodegenerative diseases*. 2013; 563481: 1-8.
3. OMS. *Background Paper 6.11 Alzheimer Disease and other Dementias* 2016 [27/05/2016]. Disponible en: http://www.who.int/medicines/areas/priority_medicines/BP6_11Alzheimer.pdf.
4. Alzheimer A. "Über einen eigenartige erkrankung der hirnrinde". *Allema Z Psych*. 1907; 64: 146-148.
5. Dubois B, Feldman HH, Jacova C y col. "Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon". *Lancet neurology*. 2010; 9(11): 1118-1127.
6. Vilalta-Franch J, Lopez-Pousa S, Calvo-Perxas L y col. "Psychosis of Alzheimer disease: prevalence, incidence, persistence, risk factors, and mortality". *The American journal of geriatric psychiatry : official journal of the American Association for Geriatric Psychiatry*. 2013; 21(11): 1135-1143.
7. Braak H, Braak E. "Neuropathological staging of Alzheimer-related changes". *Acta neuropathologica*. 1991; 82(4): 239-259.
8. Delacourte A, David JP, Sergeant N y col. "The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease". *Neurology*. 1999; 52(6): 1158-1165.
9. Scheltens P, Blennow K, Breteler MM y col. "Alzheimer's disease". *Lancet*. 2010; 9: 1118-1127.
10. Norton S, Matthews FE, Barnes DE y col. "Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: an analysis of population-based data". *Lancet neurology*. 2014; 13(8): 788-794.
11. Bartus RT, Dean RL, Pontecorvo MJ y col. "The cholinergic hypothesis: a historical overview, current perspective, and future directions". *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1985; 444: 332-358.
12. Davies P, Maloney AJ. "Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease". *Lancet*. 1976; 2(8000): 1403.
13. Nilsson L, Nordberg A, Hardy J y col. "Physostigmine restores 3H-acetylcholine efflux from Alzheimer brain slices to normal level". *Journal of neural transmission*. 1986; 67(3-4): 275-285.
14. Rylett RJ, Ball MJ, Colhoun EH. "Evidence for high affinity choline transport in synaptosomes prepared from hippocampus and neocortex of patients with Alzheimer's disease". *Brain research*. 1983; 289(1-2): 169-175.
15. Perry EK, Morris CM, Court JA y col. "Alteration in nicotine binding sites in Parkinson's disease, Lewy body dementia and Alzheimer's disease: possible index of early neuropathology". *Neuroscience*. 1995; 64(2): 385-395.

16. Giacobini E. "Cholinergic receptors in human brain: effects of aging and Alzheimer disease". *Journal of neuroscience research*. 1990; 27(4): 548-560.
17. Ehret MJ, Chamberlin KW. "Current Practices in the Treatment of Alzheimer Disease: Where is the Evidence After the Phase III Trials?". *Clinical therapeutics*. 2015; 37(8): 1604-1616.
18. Lewerenz J, Maher P. "Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases-What is the Evidence?". *Front Neurosci*. 2015; 9: 469.
19. Hardy JA, Higgins GA. "Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis". *Science*. 1992; 256(5054): 184-185.
20. Querfurth HW, LaFerla FM. "Alzheimer's disease". *The New England journal of medicine*. 2010; 362(4): 329-344.
21. Selkoe DJ. "Alzheimer's disease: a central role for amyloid". *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 1994; 53(5): 438-447.
22. Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A y col. "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor". *Nature*. 1987; 325(6106): 733-736.
23. Coulson EJ, Paliga K, Beyreuther K y col. "What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function". *Neurochemistry international*. 2000; 36(3): 175-184.
24. Dawkins E, Small DH. "Insights into the physiological function of the beta-amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease". *Journal of neurochemistry*. 2014; 129(5): 756-769.
25. Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H y col. "APP processing and synaptic function". *Neuron*. 2003; 37(6): 925-937.
26. Yan SD, Xiong WC, Stern DM. "Mitochondrial amyloid-beta peptide: pathogenesis or late-phase development?". *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2006; 9(2): 127-137.
27. Schellenberg GD, Montine TJ. "The genetics and neuropathology of Alzheimer's disease". *Acta neuropathologica*. 2012; 124(3): 305-323.
28. Selkoe DJ. "Clearing the brain's amyloid cobwebs". *Neuron*. 2001; 32(2): 177-180.
29. Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V y col. "Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease". *Science*. 2010; 330(6012): 1774.
30. Walsh DM, Selkoe DJ. "A beta oligomers - a decade of discovery". *Journal of neurochemistry*. 2007; 101(5): 1172-1184.
31. Eikelenboom P, Zhan SS, van Gool WA y col. "Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease". *Trends in pharmacological sciences*. 1994; 15(12): 447-450.
32. Hensley K, Carney JM, Mattson MP y col. "A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994; 91(8): 3270-3274.

33. Combs CK, Karlo JC, Kao SC y col. "beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis". *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2001; 21(4): 1179-1188.
34. Mark RJ, Hensley K, Butterfield DA y col. "Amyloid beta-peptide impairs ion-motive ATPase activities: evidence for a role in loss of neuronal Ca²⁺ homeostasis and cell death". *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1995; 15(9): 6239-6249.
35. Moreira PI, Santos MS, Moreno A y col. "Effect of amyloid beta-peptide on permeability transition pore: a comparative study". *Journal of neuroscience research*. 2002; 69(2): 257-267.
36. Arispe N, Pollard HB, Rojas E. "Giant multilevel cation channels formed by Alzheimer disease amyloid beta-protein [A beta P-(1-40)] in bilayer membranes". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993; 90(22): 10573-10577.
37. Braak H, Braak E, Strothjohann M. "Abnormally phosphorylated tau protein related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads in the cerebral cortex of sheep and goat". *Neuroscience letters*. 1994; 171(1-2): 1-4.
38. Herrup K. "The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis". *Nature neuroscience*. 2015; 18(6): 794-799.
39. LoPresti P, Szuchet S, Papasozomenos SC y col. "Functional implications for the microtubule-associated protein tau: localization in oligodendrocytes". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995; 92(22): 10369-10373.
40. Goedert M, Spillantini MG, Potier MC y col. "Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain". *The EMBO journal*. 1989; 8(2): 393-399.
41. Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI. "The distribution of tau in the mammalian central nervous system". *The Journal of cell biology*. 1985; 101(4): 1371-1378.
42. Spillantini MG, Goedert M. "Tau pathology and neurodegeneration". *Lancet neurology*. 2013; 12(6): 609-622.
43. Bramblett GT, Goedert M, Jakes R y col. "Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding". *Neuron*. 1993; 10(6): 1089-1099.
44. Iqbal K, Liu F, Gong CX y col. "Mechanisms of tau-induced neurodegeneration". *Acta neuropathologica*. 2009; 118(1): 53-69.
45. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M y col. "Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments". *The Journal of biological chemistry*. 1986; 261(13): 6084-6089.
46. de Calignon A, Polydoro M, Suarez-Calvet M y col. "Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease". *Neuron*. 2012; 73(4): 685-697.
47. Grundke-Iqbal I, Vorbrodt AW, Iqbal K y col. "Microtubule-associated polypeptides tau are altered in Alzheimer paired helical filaments". *Brain research*. 1988; 464(1): 43-52.

48. Ksiezak-Reding H, Liu WK, Yen SH. "Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments". *Brain research*. 1992; 597(2): 209-219.
49. Hanger DP, Betts JC, Loviny TL y col. "New phosphorylation sites identified in hyperphosphorylated tau (paired helical filament-tau) from Alzheimer's disease brain using nanoelectrospray mass spectrometry". *Journal of neurochemistry*. 1998; 71(6): 2465-2476.
50. Pei JJ, Gong CX, An WL y col. "Okadaic-acid-induced inhibition of protein phosphatase 2A produces activation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2, MEK1/2, and p70 S6, similar to that in Alzheimer's disease". *The American journal of pathology*. 2003; 163(3): 845-858.
51. Liu SJ, Zhang JY, Li HL y col. "Tau becomes a more favorable substrate for GSK-3 when it is prephosphorylated by PKA in rat brain". *The Journal of biological chemistry*. 2004; 279(48): 50078-50088.
52. Iqbal K, Grundke-Iqbal I. "Pharmacological approaches of neurofibrillary degeneration". *Current Alzheimer research*. 2005; 2(3): 335-341.
53. Poppek D, Keck S, Ermak G y col. "Phosphorylation inhibits turnover of the tau protein by the proteasome: influence of RCAN1 and oxidative stress". *The Biochemical journal*. 2006; 400(3): 511-520.
54. Khatoon S, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. "Levels of normal and abnormally phosphorylated tau in different cellular and regional compartments of Alzheimer disease and control brains". *FEBS letters*. 1994; 351(1): 80-84.
55. Rapoport M, Dawson HN, Binder LI y col. "Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002; 99(9): 6364-6369.
56. SantaCruz KS, Sonnen JA, Pezhouh MK y col. "Alzheimer disease pathology in subjects without dementia in 2 studies of aging: the Nun Study and the Adult Changes in Thought Study". *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2011; 70(10): 832-840.
57. Castellani RJ, Perry G. "The complexities of the pathology-pathogenesis relationship in Alzheimer disease". *Biochemical pharmacology*. 2014; 88(4): 671-676.
58. Braak H, Thal DR, Ghebremedhin E y col. "Stages of the pathologic process in Alzheimer disease: age categories from 1 to 100 years". *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2011; 70(11): 960-969.
59. Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET y col. "Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease". *Neurology*. 1992; 42(3): 631-639.
60. Olsen JV, Blagoev B, Gnäd F y col. "Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks". *Cell*. 2006; 127(3): 635-648.
61. Zhang M, Yogesha SD, Mayfield JE y col. "Viewing serine/threonine protein phosphatases through the eyes of drug designers". *FEBS J*. 2013; 280(19): 4739-4760.
62. Cohen P. "Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century?". *Nat Rev Drug Discov*. 2002; 1(4): 309-315.

63. McConnell JL, Wadzinski BE. "Targeting protein serine/threonine phosphatases for drug development". *Molecular pharmacology*. 2009; 75(6): 1249-1261.
64. Lajarin-Cuesta R, Arribas RL, De Los Rios C. "Ligands for Ser/Thr phosphoprotein phosphatases: a patent review (2005-2015)". *Expert Opin Ther Pat*. 2016; 26(3): 389-407.
65. Shi Y. "Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure". *Cell*. 2009; 139(3): 468-484.
66. Oliver CJ, Shenolikar S. "Physiologic importance of protein phosphatase inhibitors". *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 1998; 3: 961-972.
67. Goldberg J, Huang HB, Kwon YG y col. "Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1". *Nature*. 1995; 376(6543): 745-753.
68. Swingle MR, Amable L, Lawhorn BG y col. "Structure-activity relationship studies of fostriecin, cytostatin, and key analogs, with PP1, PP2A, PP5, and(beta12-beta13)-chimeras (PP1/PP2A and PP5/PP2A), provide further insight into the inhibitory actions of fostriecin family inhibitors". *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2009; 331(1): 45-53.
69. Swingle M, Ni L, Honkanen RE. "Small-molecule inhibitors of ser/thr protein phosphatases: specificity, use and common forms of abuse". *Methods Mol Biol*. 2007; 365: 23-38.
70. Cohen PT. "Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life". *Trends in biochemical sciences*. 1997; 22(7): 245-251.
71. Xing Y, Xu Y, Chen Y y col. "Structure of protein phosphatase 2A core enzyme bound to tumor-inducing toxins". *Cell*. 2006; 127(2): 341-353.
72. Haesen D, Sents W, Lemaire K y col. "The Basic Biology of PP2A in Hematologic Cells and Malignancies". *Frontiers in oncology*. 2014; 4: 347.
73. Sontag JM, Sontag E. "Protein phosphatase 2A dysfunction in Alzheimer's disease". *Frontiers in molecular neuroscience*. 2014; 7: 16.
74. Neviani P, Santhanam R, Trotta R y col. "The tumor suppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABL-regulated SET protein". *Cancer cell*. 2005; 8(5): 355-368.
75. Neviani P, Perrotti D. "SETting OP449 into the PP2A-activating drug family". *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2014; 20(8): 2026-2028.
76. Janssens V, Goris J. "Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling". *The Biochemical journal*. 2001; 353(Pt 3): 417-439.
77. Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K y col. "Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation". *Eur J Neurosci*. 2005; 22(8): 1942-1950.
78. Sontag E, Nunbhakdi-Craig V, Lee G y col. "Molecular interactions among protein phosphatase 2A, tau, and microtubules. Implications for the regulation of tau phosphorylation and the development of tauopathies". *J Biol Chem*. 1999; 274(36): 25490-25498.

79. Xu Y, Chen Y, Zhang P y col. "Structure of a protein phosphatase 2A holoenzyme: insights into B55-mediated Tau dephosphorylation". *Molecular cell*. 2008; 31(6): 873-885.
80. Drewes G, Mandelkow EM, Baumann K y col. "Dephosphorylation of tau protein and Alzheimer paired helical filaments by calcineurin and phosphatase-2A". *FEBS Lett*. 1993; 336(3): 425-432.
81. Gong CX, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. "Dephosphorylation of Alzheimer's disease abnormally phosphorylated tau by protein phosphatase-2A". *Neuroscience*. 1994; 61(4): 765-772.
82. Gong CX, Liu F, Grundke-Iqbal I y col. "Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease". *J Neural Transm (Vienna)*. 2005; 112(6): 813-838.
83. Wang JZ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. "Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration". *The European journal of neuroscience*. 2007; 25(1): 59-68.
84. Gong CX, Shaikh S, Wang JZ y col. "Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain". *Journal of neurochemistry*. 1995; 65(2): 732-738.
85. Gong CX, Iqbal K. "Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau: a promising therapeutic target for Alzheimer disease". *Curr Med Chem*. 2008; 15(23): 2321-2328.
86. Vogelsberg-Ragaglia V, Schuck T, Trojanowski JQ y col. "PP2A mRNA expression is quantitatively decreased in Alzheimer's disease hippocampus". *Exp Neurol*. 2001; 168(2): 402-412.
87. Sontag E, Luangpirom A, Hladik C y col. "Altered expression levels of the protein phosphatase 2A AB α C enzyme are associated with Alzheimer disease pathology". *J Neuropathol Exp Neurol*. 2004; 63(4): 287-301.
88. Sontag E, Hladik C, Montgomery L y col. "Downregulation of protein phosphatase 2A carboxyl methylation and methyltransferase may contribute to Alzheimer disease pathogenesis". *J Neuropathol Exp Neurol*. 2004; 63(10): 1080-1091.
89. Zhang CE, Tian Q, Wei W y col. "Homocysteine induces tau phosphorylation by inactivating protein phosphatase 2A in rat hippocampus". *Neurobiology of aging*. 2008; 29(11): 1654-1665.
90. Tanimukai H, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. "Up-regulation of inhibitors of protein phosphatase-2A in Alzheimer's disease". *Am J Pathol*. 2005; 166(6): 1761-1771.
91. Sontag E, Nunbhakdi-Craig V, Lee G y col. "Regulation of the phosphorylation state and microtubule-binding activity of Tau by protein phosphatase 2A". *Neuron*. 1996; 17(6): 1201-1207.
92. Sun L, Liu SY, Zhou XW y col. "Inhibition of protein phosphatase 2A- and protein phosphatase 1-induced tau hyperphosphorylation and impairment of spatial memory retention in rats". *Neuroscience*. 2003; 118(4): 1175-1182.
93. Louis JV, Martens E, Borghgraef P y col. "Mice lacking phosphatase PP2A subunit PR61/B δ (Ppp2r5d) develop spatially restricted tauopathy by deregulation of CDK5 and GSK3 β ". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011; 108(17): 6957-6962.

94. Sontag E, Nunbhakdi-Craig V, Sontag JM y col. "Protein phosphatase 2A methyltransferase links homocysteine metabolism with tau and amyloid precursor protein regulation". *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007; 27(11): 2751-2759.
95. Yao XQ, Zhang XX, Yin YY y col. "Glycogen synthase kinase-3beta regulates Tyr307 phosphorylation of protein phosphatase-2A via protein tyrosine phosphatase 1B but not Src". *The Biochemical journal*. 2011; 437(2): 335-344.
96. Yao XQ, Li XC, Zhang XX y col. "Glycogen synthase kinase-3beta regulates leucine-309 demethylation of protein phosphatase-2A via PPMT1 and PME-1". *FEBS letters*. 2012; 586(16): 2522-2528.
97. Chan SF, Sucher NJ. "An NMDA receptor signaling complex with protein phosphatase 2A". *J Neurosci*. 2001; 21(20): 7985-7992.
98. Farinelli M, Heitz FD, Grewe BF y col. "Selective regulation of NR2B by protein phosphatase-1 for the control of the NMDA receptor in neuroprotection". *PloS one*. 2012; 7(3): e34047.
99. Voronkov M, Braithwaite SP, Stock JB. "Phosphoprotein phosphatase 2A: a novel druggable target for Alzheimer's disease". *Future Med Chem*. 2011; 3(7): 821-833.
100. Pelech S, Cohen P. "The protein phosphatases involved in cellular regulation. 1. Modulation of protein phosphatases-1 and 2A by histone H1, protamine, polylysine and heparin". *Eur J Biochem*. 1985; 148(2): 245-251.
101. Dobrowsky RT, Kamibayashi C, Mumby MC y col. "Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A". *The Journal of biological chemistry*. 1993; 268(21): 15523-15530.
102. Gutierrez A, Pan L, Groen RW y col. "Phenothiazines induce PP2A-mediated apoptosis in T cell acute lymphoblastic leukemia". *The Journal of clinical investigation*. 2014; 124(2): 644-655.
103. Neviani P, Santhanam R, Oaks JJ y col. "FTY720, a new alternative for treating blast crisis chronic myelogenous leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia". *The Journal of clinical investigation*. 2007; 117(9): 2408-2421.
104. Neviani P, Harb JG, Oaks JJ y col. "PP2A-activating drugs selectively eradicate TKI-resistant chronic myeloid leukemic stem cells". *The Journal of clinical investigation*. 2013; 123(10): 4144-4157.
105. Cristobal I, Garcia-Orti L, Cirauqui C y col. "PP2A impaired activity is a common event in acute myeloid leukemia and its activation by forskolin has a potent anti-leukemic effect". *Leukemia*. 2011; 25(4): 606-614.
106. Barranco Quintana JL, Allam MF, Serrano Del Castillo A y col. "Alzheimer's disease and coffee: a quantitative review". *Neurological research*. 2007; 29(1): 91-95.
107. Basurto-Islas G, Blanchard J, Tung YC y col. "Therapeutic benefits of a component of coffee in a rat model of Alzheimer's disease". *Neurobiology of aging*. 2014; 35(12): 2701-2712.
108. Kickstein E, Krauss S, Thornhill P y col. "Biguanide metformin acts on tau phosphorylation via mTOR/protein phosphatase 2A (PP2A) signaling". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010; 107(50): 21830-21835.

109. Koh PO. "Melatonin attenuates decrease of protein phosphatase 2A subunit B in ischemic brain injury". *J Pineal Res.* 2012; 52(1): 57-61.
110. Chohan MO, Khatoon S, Iqbal IG y col. "Involvement of I2PP2A in the abnormal hyperphosphorylation of tau and its reversal by Memantine". *FEBS letters.* 2006; 580(16): 3973-3979.
111. Li L, Sengupta A, Haque N y col. "Memantine inhibits and reverses the Alzheimer type abnormal hyperphosphorylation of tau and associated neurodegeneration". *FEBS letters.* 2004; 566(1-3): 261-269.
112. Noh MY, Koh SH, Kim SM y col. "Neuroprotective effects of donepezil against Abeta42-induced neuronal toxicity are mediated through not only enhancing PP2A activity but also regulating GSK-3beta and nAChRs activity". *Journal of neurochemistry.* 2013; 127(4): 562-574.
113. Corcoran NM, Martin D, Hutter-Paier B y col. "Sodium selenate specifically activates PP2A phosphatase, dephosphorylates tau and reverses memory deficits in an Alzheimer's disease model". *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia.* 2010; 17(8): 1025-1033.
114. van Eersel J, Ke YD, Liu X y col. "Sodium selenate mitigates tau pathology, neurodegeneration, and functional deficits in Alzheimer's disease models". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2010; 107(31): 13888-13893.
115. Malpas CB, Vivash L, Genc S y col. "A Phase IIa Randomized Control Trial of VEL015 (Sodium Selenate) in Mild-Moderate Alzheimer's Disease". *Journal of Alzheimer's disease : JAD.* 2016; 54(1): 223-232.
116. Berridge MJ. "Calcium hypothesis of Alzheimer's disease". *Pflugers Arch.* 2010; 459(3): 441-449.
117. Mattson MP, Chan SL. "Dysregulation of cellular calcium homeostasis in Alzheimer's disease: bad genes and bad habits". *Journal of molecular neuroscience : MN.* 2001; 17(2): 205-224.
118. Berridge MJ. "Calcium regulation of neural rhythms, memory and Alzheimer's disease". *The Journal of physiology.* 2014; 592(2): 281-293.
119. Simpson PB, Russell JT. "Role of mitochondrial Ca²⁺ regulation in neuronal and glial cell signalling". *Brain research Brain research reviews.* 1998; 26(1): 72-81.
120. Khachaturian ZS. "Calcium hypothesis of Alzheimer's disease and brain aging". *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1994; 747: 1-11.
121. Kuchibhotla KV, Goldman ST, Lattarulo CR y col. "Abeta plaques lead to aberrant regulation of calcium homeostasis in vivo resulting in structural and functional disruption of neuronal networks". *Neuron.* 2008; 59(2): 214-225.
122. Mattson MP. "Antigenic changes similar to those seen in neurofibrillary tangles are elicited by glutamate and Ca²⁺ influx in cultured hippocampal neurons". *Neuron.* 1990; 4(1): 105-117.
123. Querfurth HW, Selkoe DJ. "Calcium ionophore increases amyloid beta peptide production by cultured cells". *Biochemistry.* 1994; 33(15): 4550-4561.

124. Mattson MP, Cheng B, Davis D y col. "beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity". *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1992; 12(2): 376-389.
125. Ueda K, Shinohara S, Yagami T y col. "Amyloid beta protein potentiates Ca²⁺ influx through L-type voltage-sensitive Ca²⁺ channels: a possible involvement of free radicals". *Journal of neurochemistry*. 1997; 68(1): 265-271.
126. Guo Q, Furukawa K, Sopher BL y col. "Alzheimer's PS-1 mutation perturbs calcium homeostasis and sensitizes PC12 cells to death induced by amyloid beta-peptide". *Neuroreport*. 1996; 8(1): 379-383.
127. Ichimiya Y, Emson PC, Mountjoy CQ y col. "Loss of calbindin-28K immunoreactive neurones from the cortex in Alzheimer-type dementia". *Brain research*. 1988; 475(1): 156-159.
128. Duchen MR. "Mitochondria, calcium-dependent neuronal death and neurodegenerative disease". *Pflugers Arch*. 2012; 464(1): 111-121.
129. Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV y col. "Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo". *Nature*. 2002; 416(6880): 535-539.
130. Fatt P, Ginsborg BL. "The ionic requirements for the production of action potentials in crustacean muscle fibres". *The Journal of physiology*. 1958; 142(3): 516-543.
131. Garcia AG, Garcia-De-Diego AM, Gandia L y col. "Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells". *Physiological reviews*. 2006; 86(4): 1093-1131.
132. Arranz-Tagarro JA, de los Rios C, Garcia AG y col. "Recent patents on calcium channel blockers: emphasis on CNS diseases". *Expert Opin Ther Pat*. 2014; 24(9): 959-977.
133. Zamponi GW. "Targeting voltage-gated calcium channels in neurological and psychiatric diseases". *Nat Rev Drug Discov*. 2016; 15(1): 19-34.
134. Nimmrich V, Eckert A. "Calcium channel blockers and dementia". *Br J Pharmacol*. 2013; 169(6): 1203-1210.
135. Olivera BM, Imperial JS, Cruz LJ y col. "Calcium channel-targeted polypeptide toxins". *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1991; 635: 114-122.
136. Brewer LD, Thibault O, Staton J y col. "Increased vulnerability of hippocampal neurons with age in culture: temporal association with increases in NMDA receptor current, NR2A subunit expression and recruitment of L-type calcium channels". *Brain research*. 2007; 1151: 20-31.
137. Scragg JL, Fearon IM, Boyle JP y col. "Alzheimer's amyloid peptides mediate hypoxic up-regulation of L-type Ca²⁺ channels". *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2005; 19(1): 150-152.
138. Price SA, Held B, Pearson HA. "Amyloid beta protein increases Ca²⁺ currents in rat cerebellar granule neurones". *Neuroreport*. 1998; 9(3): 539-545.
139. He LM, Chen LY, Lou XL y col. "Evaluation of beta-amyloid peptide 25-35 on calcium homeostasis in cultured rat dorsal root ganglion neurons". *Brain research*. 2002; 939(1-2): 65-75.

140. Weiss JH, Pike CJ, Cotman CW. "Ca²⁺ channel blockers attenuate beta-amyloid peptide toxicity to cortical neurons in culture". *Journal of neurochemistry*. 1994; 62(1): 372-375.
141. Anekonda TS, Quinn JF, Harris C y col. "L-type voltage-gated calcium channel blockade with isradipine as a therapeutic strategy for Alzheimer's disease". *Neurobiology of disease*. 2011; 41(1): 62-70.
142. Asakura K, Matsuo Y, Kanemasa T y col. "P/Q-type Ca²⁺ channel blocker omega-agatoxin IVA protects against brain injury after focal ischemia in rats". *Brain research*. 1997; 776(1-2): 140-145.
143. Berman RF, Verweij BH, Muizelaar JP. "Neurobehavioral protection by the neuronal calcium channel blocker ziconotide in a model of traumatic diffuse brain injury in rats". *J Neurosurg*. 2000; 93(5): 821-828.
144. Popovic M, Caballero-Bleda M, Popovic N y col. "Neuroprotective effect of chronic verapamil treatment on cognitive and noncognitive deficits in an experimental Alzheimer's disease in rats". *The International journal of neuroscience*. 1997; 92(1-2): 79-93.
145. Hosaka T, Yamamoto YL, Diksic M. "Efficacy of retrograde perfusion of the cerebral vein with verapamil after focal ischemia in rat brain". *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1991; 22(12): 1562-1566.
146. Freir DB, Costello DA, Herron CE. "A beta 25-35-induced depression of long-term potentiation in area CA1 in vivo and in vitro is attenuated by verapamil". *Journal of neurophysiology*. 2003; 89(6): 3061-3069.
147. Trompet S, Westendorp RG, Kamper AM y col. "Use of calcium antagonists and cognitive decline in old age. The Leiden 85-plus study". *Neurobiology of aging*. 2008; 29(2): 306-308.
148. Becker C, Jick SS, Meier CR. "Use of antihypertensives and the risk of Parkinson disease". *Neurology*. 2008; 70(16 Pt 2): 1438-1444.
149. Hogan MJ, Gjedde A, Hakim AM. "In vivo binding of nimodipine in the brain: II. Binding kinetics in focal cerebral ischemia". *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 1991; 11(5): 771-778.
150. Lopez-Arrieta JM, Birks J. "Nimodipine for primary degenerative, mixed and vascular dementia". *The Cochrane database of systematic reviews*. 2002; (3): CD000147.
151. Forette F, Seux ML, Staessen JA y col. "The prevention of dementia with antihypertensive treatment: new evidence from the Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) study". *Archives of internal medicine*. 2002; 162(18): 2046-2052.
152. Hanyu H, Hirao K, Shimizu S y col. "Nilvadipine prevents cognitive decline of patients with mild cognitive impairment". *International journal of geriatric psychiatry*. 2007; 22(12): 1264-1266.
153. Yamamoto T, Takahara A. "Recent updates of N-type calcium channel blockers with therapeutic potential for neuropathic pain and stroke". *Current topics in medicinal chemistry*. 2009; 9(4): 377-395.
154. Scott VE, Vortherms TA, Niforatos W y col. "A-1048400 is a novel, orally active, state-dependent neuronal calcium channel blocker that produces dose-dependent antinociception without altering hemodynamic function in rats". *Biochemical pharmacology*. 2012; 83(3): 406-418.

155. Zenyaku Kogyo Kabushikikaisha. Use of $\text{Ca}_v3.1$ selective T-type calcium channel antagonists. WO2012094615; 2012.
156. Nunomura A, Perry G, Aliev G y col. "Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease". *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2001; 60(8): 759-767.
157. Moreira PI, Carvalho C, Zhu X y col. "Mitochondrial dysfunction is a trigger of Alzheimer's disease pathophysiology". *Biochimica et biophysica acta*. 2010; 1802(1): 2-10.
158. Wang X, Su B, Zheng L y col. "The role of abnormal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of Alzheimer's disease". *Journal of neurochemistry*. 2009; 109 Suppl 1: 153-159.
159. Parker WD, Jr., Mahr NJ, Filley CM y col. "Reduced platelet cytochrome c oxidase activity in Alzheimer's disease". *Neurology*. 1994; 44(6): 1086-1090.
160. Lustbader JW, Cirilli M, Lin C y col. "ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease". *Science*. 2004; 304(5669): 448-452.
161. Greenough MA, Camakaris J, Bush AI. "Metal dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease". *Neurochemistry international*. 2013; 62(5): 540-555.
162. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. "Mitochondria, oxidants, and aging". *Cell*. 2005; 120(4): 483-495.
163. Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J y col. "Neuroinflammation in Alzheimer's disease". *Lancet neurology*. 2015; 14(4): 388-405.
164. Gravitz L. "Drugs: a tangled web of targets". *Nature*. 2011; 475(7355): S9-11.
165. Tayeb HO, Murray ED, Price BH y col. "Bapineuzumab and solanezumab for Alzheimer's disease: is the 'amyloid cascade hypothesis' still alive?". *Expert opinion on biological therapy*. 2013; 13(7): 1075-1084.
166. Hornberg JJ. "Simple Drugs Do Not Cure Complex Diseases: The Need for Multi-Target Drugs". In: Chemistry RSo, editor. Designing Multi-target Drugs. UK. 2012. p. 1-13.
167. Csermely P, Agoston V, Pongor S. "The efficiency of multi-target drugs: the network approach might help drug design". *Trends in pharmacological sciences*. 2005; 26(4): 178-182.
168. Nikolic K, Mavridis L, Djikic T y col. "Drug Design for CNS Diseases: Polypharmacological Profiling of Compounds Using Cheminformatic, 3D-QSAR and Virtual Screening Methodologies". *Frontiers in neuroscience*. 2016; 10: 265.
169. Monzon Jose G DJ. "Combination Agents Versus Multi-Targeted Agents- Pros y Cons". In: Chemistry RSo, editor. Designing Multi-Target Drugs. UK. 2012. p. 155-181.
170. Lu JJ, Pan W, Hu YJ y col. "Multi-target drugs: the trend of drug research and development". *PloS one*. 2012; 7(6): e40262.
171. Carreiras MC, Mendes E, Perry MJ y col. "The multifactorial nature of Alzheimer's disease for developing potential therapeutics". *Curr Top Med Chem*. 2013; 13(15): 1745-1770.

172. Ismaili L, Refouvelet B, Benchekroun M y col. "Multitarget compounds bearing tacrine- and donepezil-like structural and functional motifs for the potential treatment of Alzheimer's disease". *Progress in neurobiology*. 2016. In press. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.12.003>
173. Leon R, Garcia AG, Marco-Contelles J. "Recent advances in the multitarget-directed ligands approach for the treatment of Alzheimer's disease". *Medicinal research reviews*. 2013; 33(1): 139-189.
174. Weinreb O, Amit T, Bar-Am O y col. "Ladostigil: a novel multimodal neuroprotective drug with cholinesterase and brain-selective monoamine oxidase inhibitory activities for Alzheimer's disease treatment". *Current drug targets*. 2012; 13(4): 483-494.
175. Kupersmidt L, Amit T, Bar-Am O y col. "Multi-target, neuroprotective and neurorestorative M30 improves cognitive impairment and reduces Alzheimer's-like neuropathology and age-related alterations in mice". *Molecular neurobiology*. 2012; 46(1): 217-220.
176. Fernandez-Bachiller MI, Perez C, Gonzalez-Munoz GC y col. "Novel tacrine-8-hydroxyquinoline hybrids as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease, with neuroprotective, cholinergic, antioxidant, and copper-complexing properties". *Journal of medicinal chemistry*. 2010; 53(13): 4927-4937.
177. Marco-Contelles J, Unzeta M, Bolea I y col. "ASS234, As a New Multi-Target Directed Propargylamine for Alzheimer's Disease Therapy". *Frontiers in neuroscience*. 2016; 10: 294.
178. Arce MP, Rodriguez-Franco MI, Gonzalez-Munoz GC y col. "Neuroprotective and cholinergic properties of multifunctional glutamic acid derivatives for the treatment of Alzheimer's disease". *Journal of medicinal chemistry*. 2009; 52(22): 7249-7257.
179. Lorrio S, Gomez-Rangel V, Negredo P y col. "Novel multitarget ligand ITH33/IQM9.21 provides neuroprotection in in vitro and in vivo models related to brain ischemia". *Neuropharmacology*. 2013; 67: 403-411.
180. Gonzalez-Munoz GC, Arce MP, Perez C y col. "Dibenzo[1,4,5]thiadiazepine: a hardly-known heterocyclic system with neuroprotective properties of potential usefulness in the treatment of neurodegenerative diseases". *European journal of medicinal chemistry*. 2014; 81: 350-358.
181. Jiang H, Wang X, Huang L y col. "Benzenediol-berberine hybrids: multifunctional agents for Alzheimer's disease". *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2011; 19(23): 7228-7235.
182. Di Martino RM, De Simone A, Andrisano V y col. "Versatility of the Curcumin Scaffold: Discovery of Potent and Balanced Dual BACE-1 and GSK-3 β Inhibitors". *Journal of medicinal chemistry*. 2016; 59(2): 531-544.
183. W S. "Über die Konstitution der Grignardschen Magnesiumverbindungen". *Chem Ber*. 1929; 62: 920.
184. Baell JB, Holloway GA. "New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays". *J Med Chem*. 2010; 53(7): 2719-2740.
185. Na YM, Le Borgne M, Pagniez F y col. "Synthesis and antifungal activity of new 1-halogenobenzyl-3-imidazolylmethylindole derivatives". *Eur J Med Chem*. 2003; 38(1): 75-87.

186. Evans DA, Scheidt KA, Fandrick KR y col. "Enantioselective indole Friedel-Crafts alkylations catalyzed by bis(oxazoliny)pyridine-scandium(III) triflate complexes". *J Am Chem Soc.* 2003; 125(36): 10780-10781.
187. Haider N, Kabicher T, Kaferbock J y col. "Synthesis and in-vitro antitumor activity of 1-[3-(indol-1-yl)prop-1-yn-1-yl]phthalazines and related compounds". *Molecules.* 2007; 12(8): 1900-1909.
188. Evans DA, Fandrick KR, Song HJ. "Enantioselective Friedel-Crafts alkylations of α,β -unsaturated 2-acyl imidazoles catalyzed by bis(oxazoliny)pyridine-scandium(III) triflate complexes". *J Am Chem Soc.* 2005; 127(25): 8942-8943.
189. Li Y, Chen J, Qiu R y col. "Cesium hydroxide-catalyzed isomerization of terminal alkynes for the synthesis of O-allenes and N-allenes". *Tetrahedron Lett.* 2015; 56: 5504-5507.
190. Perez EG, Ocampo C, Feuerbach D y col. "Novel 1-(1-benzyl-1H-indol-3-yl)-N,N,N-trimethylmethanaminium iodides are competitive antagonists for the human $\alpha 4\beta 2$ and $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors". *MedChemComm.* 2013; 4: 1166-1170.
191. Baehn S, Imm S, Mevius K y col. "Selective ruthenium-catalyzed N-alkylation of indoles by using alcohols". *Chem - Eur J.* 2010; 16: 3590-3593, S3590/S3591-S3590/S3514.
192. Wu P-W, Hsieh W-T, Cheng Y-M y col. "Synthesis of 7-Azaserotonin: Its Photophysical Properties Associated with Excited State Proton Transfer Reaction". *J Am Chem Soc.* 2006; 128: 14426-14427.
193. Garcia-Frutos EM, Gomez-Lor B. "Synthesis and Self-Association Properties of Functionalized C3-Symmetric Hexakis(p-substituted-phenylethynyl)triindoles". *J Am Chem Soc.* 2008; 130: 9173-9177.
194. Laha JK, Bhimpuria RA, Prajapati DV y col. "Palladium-catalyzed regioselective C-2 arylation of 7-azaindoles, indoles, and pyrroles with arenes". *Chem Commun.* 2016; 52: 4329-4332.
195. Martelli C, Coronello M, Dei S y col. "Structure-activity relationships studies in a series of N,N-bis(alkanol)amine aryl esters as P-glycoprotein (Pgp) dependent multidrug resistance (MDR) inhibitors". *J Med Chem.* 2010; 53(4): 1755-1762.
196. Henry DW, Leete E. "Amine oxides. I. Gramine oxide". *J Am Chem Soc.* 1957; 79: 5254-5256.
197. Harada H, Fujii A, Odai O y col. "Process Development of a Scaleable Route to (2R)-[3-(2-Aminopropyl)-1H-indol-7-yloxy]-N,N-diethylacetamide: A Key Intermediate for AJ-9677, a Potent and Selective Human and Rat $\beta 3$ -Adrenergic Receptor Agonist". *Org Process Res Dev.* 2004; 8: 238-245.
198. Isgor YG, Kilic Z, Olgen S. "Novel aminomethylindole derivatives as inhibitors of pp60c-Src tyrosine kinase: synthesis and biological activity". *Chem Biol Drug Des.* 2008; 72: 599-604.
199. Miranda S, Lopez-Alvarado P, Avendano C y col. "Convenient synthesis of highly functionalized, 3,4-disubstituted indole building blocks". *Open Org Chem J.* 2007; 1: 1-12.
200. Matuszak CA, Matuszak AJ. "Readily available anhydrous ether solutions of hydrogen chloride". *J Chem Educ.* 1967; 44: 108.

- 201.** Bandini M, Eichholzer A. "Enantioselective Gold-Catalyzed Allylic Alkylation of Indoles with Alcohols: An Efficient Route to Functionalized Tetrahydrocarbazoles". *Angew Chem, Int Ed.* 2009; 48: 9533-9537, S9533/9531-S9533/9577.
- 202.** Sharifi A, Mirzaei M, Naimi-Jamal MR. "Solvent-free aminoalkylation of phenols and indoles assisted by microwave irradiation". *Monatsh Chem.* 2001; 132: 875-880.
- 203.** Thomsen R, Christensen MH. "MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking". *Journal of medicinal chemistry.* 2006; 49(11): 3315-3321.
- 204.** Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M y col. "Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones". *Cancer research.* 1978; 38(11 Pt 1): 3751-3757.
- 205.** Korecka JA, van Kesteren RE, Blaas E y col. "Phenotypic characterization of retinoic acid differentiated SH-SY5Y cells by transcriptional profiling". *PloS one.* 2013; 8(5): e63862.
- 206.** Kume T, Kawato Y, Osakada F y col. "Dibutyryl cyclic AMP induces differentiation of human neuroblastoma SH-SY5Y cells into a noradrenergic phenotype". *Neuroscience letters.* 2008; 443(3): 199-203.
- 207.** Arun P, Madhavarao CN, Moffett JR y col. "Antipsychotic drugs increase N-acetylaspartate and N-acetylaspartylglutamate in SH-SY5Y human neuroblastoma cells". *Journal of neurochemistry.* 2008; 106(4): 1669-1680.
- 208.** Gould J, Reeve HL, Vaughan PF y col. "Nicotinic acetylcholine receptors in human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells". *Neuroscience letters.* 1992; 145(2): 201-204.
- 209.** Reeve HL, Vaughan PF, Peers C. "Glibenclamide inhibits a voltage-gated K⁺ current in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y". *Neuroscience letters.* 1992; 135(1): 37-40.
- 210.** Reuveny E, Narahashi T. "Two types of high voltage-activated calcium channels in SH-SY5Y human neuroblastoma cells". *Brain research.* 1993; 603(1): 64-73.
- 211.** Larsson KP, Hansen AJ, Dissing S. "The human SH-SY5Y neuroblastoma cell-line expresses a functional P2X7 purinoceptor that modulates voltage-dependent Ca²⁺ channel function". *Journal of neurochemistry.* 2002; 83(2): 285-298.
- 212.** Kazmi SM, Mishra RK. "Opioid receptors in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: evidence for distinct morphine (mu) and enkephalin (delta) binding sites". *Biochemical and biophysical research communications.* 1986; 137(2): 813-820.
- 213.** Yanez M, Galan L, Matias-Guiu J y col. "CSF from amyotrophic lateral sclerosis patients produces glutamate independent death of rat motor brain cortical neurons: protection by resveratrol but not riluzole". *Brain research.* 2011; 1423: 77-86.
- 214.** Egea J, Rosa AO, Sobrado M y col. "Neuroprotection afforded by nicotine against oxygen and glucose deprivation in hippocampal slices is lost in alpha7 nicotinic receptor knockout mice". *Neuroscience.* 2007; 145(3): 866-872.
- 215.** Livett BG. "Adrenal medullary chromaffin cells in vitro". *Physiological reviews.* 1984; 64(4): 1103-1161.

- 216.** Moro MA, Lopez MG, Gandia L y col. "Separation and culture of living adrenaline- and noradrenaline-containing cells from bovine adrenal medullae". *Anal Biochem.* 1990; 185(2): 243-248.
- 217.** Samadi A, Valderas C, de los Rios C y col. "Cholinergic and neuroprotective drugs for the treatment of Alzheimer and neuronal vascular diseases. II. Synthesis, biological assessment, and molecular modelling of new tacrine analogues from highly substituted 2-aminopyridine-3-carbonitriles". *Bioorganic & medicinal chemistry.* 2011; 19(1): 122-133.
- 218.** Sittampalam, G. S., Nelson, H. y col. "Assay Guidance Manual". Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004.
- 219.** McAvoy T, Nairn AC. "Serine/threonine protein phosphatase assays". *Curr Protoc Mol Biol.* 2010; Chapter 18: Unit18.
- 220.** Hamill OP, Marty A, Neher E y col. "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches". *Pflugers Arch.* 1981; 391(2): 85-100.
- 221.** Korn SJ, Horn R. "Influence of sodium-calcium exchange on calcium current rundown and the duration of calcium-dependent chloride currents in pituitary cells, studied with whole cell and perforated patch recording". *The Journal of general physiology.* 1989; 94(5): 789-812.
- 222.** Newman DJ, Cragg GM. "Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010". *Journal of natural products.* 2012; 75(3): 311-335.
- 223.** Williams P, Sorribas A, Howes MJ. "Natural products as a source of Alzheimer's drug leads". *Natural product reports.* 2011; 28(1): 48-77.
- 224.** da Rocha MD, Viegas FP, Campos HC y col. "The role of natural products in the discovery of new drug candidates for the treatment of neurodegenerative disorders II: Alzheimer's disease". *CNS & neurological disorders drug targets.* 2011; 10(2): 251-270.
- 225.** Calcul L, Zhang B, Jinwal UK y col. "Natural products as a rich source of tau-targeting drugs for Alzheimer's disease". *Future medicinal chemistry.* 2012; 4(13): 1751-1761.
- 226.** Berkov S, Cuadrado M, Osorio E y col. "Three new alkaloids from *Galanthus nivalis* and *Galanthus elwesii*". *Planta medica.* 2009; 75(12): 1351-1355.
- 227.** Nordberg A, Svensson AL. "Cholinesterase inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease: a comparison of tolerability and pharmacology". *Drug safety : an international journal of medical toxicology and drug experience.* 1998; 19(6): 465-480.
- 228.** Shytle RD, Tan J, Bickford PC y col. "Optimized turmeric extract reduces beta-Amyloid and phosphorylated Tau protein burden in Alzheimer's transgenic mice". *Current Alzheimer research.* 2012; 9(4): 500-506.
- 229.** Shah FA, Park DJ, Gim SA y col. "Curcumin treatment recovery the decrease of protein phosphatase 2A subunit B induced by focal cerebral ischemia in Sprague-Dawley rats". *Laboratory animal research.* 2015; 31(3): 134-138.
- 230.** Shi LL, Yang WN, Chen XL y col. "The protective effects of tanshinone IIA on neurotoxicity induced by beta-amyloid protein through calpain and the p35/Cdk5 pathway in primary cortical neurons". *Neurochemistry international.* 2012; 61(2): 227-235.

231. Orekhov AP, Norkina SS, Maximova T. "The alkaloids of *Arundo donax* L". *Ber Dtsch Chem Ges B*. 1935; 68B: 436-437.
232. Semenov BB, Granik VG. "Chemistry of N-(1H-indol-3-ylmethyl)-N,N-dimethylamine (Gramine): A Review". *Pharm Chem J*. 2004; 38: 287-310.
233. Niemeyer HM, Roveri OA. "Effects of gramine on energy metabolism of rat and bovine mitochondria". *Biochemical pharmacology*. 1984; 33(19): 2973-2979.
234. Settimo AD, Primofiore G, Ferrarini PL. "Bromoderivatives of gramines. Preparation and pharmacological properties". *Eur J Med Chem*. 1983; 18(3): 261-267.
235. Erspamer V. "Gramine derivatives antagonistic to 5-hydroxytryptamine (enteramine)". *Science*. 1955; 121(3141): 369-370.
236. Ehrhart G, Hennig I. "1-Benzylgramine derivatives with serotonin-antagonistic action". *Arch Pharm*. 1961; 294/66: 550-555.
237. Foldi G, Silvestrin B, Dorigo P y col. "Gramine: a vasorelaxing alkaloid acting on 5-HT(2A) receptors". *Planta medica*. 2004; 70(4): 373-375.
238. Pullagurla MR, Dukat M, Setola V y col. "N1-benzenesulfonylgramine and N1-benzenesulfonylskatole: novel 5-HT6 receptor ligand templates". *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2003; 13(19): 3355-3359.
239. Da Settimo A, Primofiore G, Ferrarini PL y col. "Bromo derivatives of gramines. Preparation and pharmacological properties". *Eur J Med Chem - Chim Ther*. 1983; 18): 261-267.
240. Shukla PK, Gautam L, Sinha M y col. "Structures and binding studies of the complexes of phospholipase A2 with five inhibitors". *Biochimica et biophysica acta*. 2015; 1854(4): 269-277.
241. Olgen S, Kilic-Kurt Z, Sener F y col. "Evaluation of novel aminomethyl indole derivatives as Src kinase inhibitors and antioxidant agents". *Chemotherapy*. 2011; 57(1): 1-6.
242. Iwata S, Saito S, Kon-ya K y col. "Novel marine-derived halogen-containing gramine analogues induce vasorelaxation in isolated rat aorta". *Eur J Pharmacol*. 2001; 432(1): 63-70.
243. Nakahata N, Harada Y, Tsuji M y col. "Structure-activity relationship of gramine derivatives in Ca(2+) release from sarcoplasmic reticulum". *European journal of pharmacology*. 1999; 382(2): 129-132.
244. Lockhart B, Closier M, Howard K y col. "Differential inhibition of [3H]-oxotremorine-M and [3H]-quinuclidinyl benzilate binding to muscarinic receptors in rat brain membranes with acetylcholinesterase inhibitors". *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2001; 363(4): 429-438.
245. Shuker MA, Bowser-Riley F, Davies SN. "Possible NMDA antagonist properties of drugs that affect high pressure neurological syndrome". *British journal of pharmacology*. 1994; 111(3): 951-955.
246. Ke S, Shi L, Cao X y col. "Heterocycle-functional gramine analogues: solvent- and catalyst-free synthesis and their inhibition activities against cell proliferation". *European journal of medicinal chemistry*. 2012; 54: 248-254.

247. Kamat PK, Rai S, Swarnkar S y col. "Molecular and cellular mechanism of okadaic acid (OKA)-induced neurotoxicity: a novel tool for Alzheimer's disease therapeutic application". *Molecular neurobiology*. 2014; 50(3): 852-865.
248. Swingle M, Ni L, Honkanen RE. "Small-molecule inhibitors of ser/thr protein phosphatases: specificity, use and common forms of abuse". *Methods Mol Biol*. 2007; 365: 23-38.
249. Perez M, Hernandez F, Gomez-Ramos A y col. "Formation of aberrant phosphotau fibrillar polymers in neural cultured cells". *European journal of biochemistry / FEBS*. 2002; 269(5): 1484-1489.
250. Del Barrio L, Martin-de-Saavedra MD, Romero A y col. "Neurotoxicity induced by okadaic acid in the human neuroblastoma SH-SY5Y line can be differentially prevented by alpha7 and beta2* nicotinic stimulation". *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2011; 123(1): 193-205.
251. Wang YP, Li XT, Liu SJ y col. "Melatonin ameliorated okadaic-acid induced Alzheimer-like lesions". *Acta pharmacologica Sinica*. 2004; 25(3): 276-280.
252. Montilla-Lopez P, Munoz-Agueda MC, Feijoo Lopez M y col. "Comparison of melatonin versus vitamin C on oxidative stress and antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease induced by okadaic acid in neuroblastoma cells". *European journal of pharmacology*. 2002; 451(3): 237-243.
253. Romero A, Egea J, Garcia AG y col. "Synergistic neuroprotective effect of combined low concentrations of galantamine and melatonin against oxidative stress in SH-SY5Y neuroblastoma cells". *Journal of pineal research*. 2010; 49(2): 141-148.
254. Kiely M, Kiely PA. "PP2A: The Wolf in Sheep's Clothing?". *Cancers*. 2015; 7(2): 648-669.
255. Takai A, Murata M, Torigoe K y col. "Inhibitory effect of okadaic acid derivatives on protein phosphatases. A study on structure-affinity relationship". *The Biochemical journal*. 1992; 284 (Pt 2): 539-544.
256. Frydrychowski VA, Urbanek RA, Dounay AB y col. "Importance of the C28-C38 hydrophobic domain of okadaic acid for potent inhibition of protein serine-threonine phosphatases 1 and 2A". *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2001; 11(5): 647-649.
257. de Los Rios C, Egea J, Marco-Contelles J y col. "Synthesis, inhibitory activity of cholinesterases, and neuroprotective profile of novel 1,8-naphthyridine derivatives". *J Med Chem*. 2010; 53(14): 5129-5143.
258. Lorrio S, Romero A, Gonzalez-Lafuente L y col. "PP2A ligand ITH12246 protects against memory impairment and focal cerebral ischemia in mice". *ACS Chem Neurosci*. 2013; 4(9): 1267-1277.
259. Lambrecht C, Haesen D, Sents W y col. "Structure, regulation, and pharmacological modulation of PP2A phosphatases". *Methods Mol Biol*. 2013; 1053: 283-305.
260. Lajarin-Cuesta R, Nanclares C, Arranz-Tagarro JA y col. "Gramine Derivatives Targeting Ca(2+) Channels and Ser/Thr Phosphatases: A New Dual Strategy for the Treatment of Neurodegenerative Diseases". *Journal of medicinal chemistry*. 2016; 59(13): 6265-6280.
261. Hernandez MZ, Cavalcanti SM, Moreira DR y col. "Halogen atoms in the modern medicinal chemistry: hints for the drug design". *Current drug targets*. 2010; 11(3): 303-314.

262. Bissantz C, Kuhn B, Stahl M. "A medicinal chemist's guide to molecular interactions". *Journal of medicinal chemistry*. 2010; 53(14): 5061-5084.
263. Derek L. In The Pipeline [Internet]. Medicine ST, editor: American Association for the Advancement of Science. 2014. [acceso 07/09/2016].
264. Langmuir I. "The Structure of Atoms and the Octet Theory of Valence". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1919; 5(7): 252-259.
265. Meanwell NA. "Synopsis of some recent tactical application of bioisosteres in drug design". *Journal of medicinal chemistry*. 2011; 54(8): 2529-2591.
266. Fast W, Levsky ME, Marletta MA y col. "N omega-propargyl-L-arginine and N omega-hydroxy-N omega-propargyl-L-arginine are inhibitors, but not inactivators, of neuronal and macrophage nitric oxide synthases". *Bioorganic & medicinal chemistry*. 1997; 5(8): 1601-1608.
267. Yogev-Falach M, Amit T, Bar-Am O y col. "Involvement of MAP kinase in the regulation of amyloid precursor protein processing by novel cholinesterase inhibitors derived from rasagiline". *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2002; 16(12): 1674-1676.
268. Weinreb O, Amit T, Bar-Am O y col. "Induction of neurotrophic factors GDNF and BDNF associated with the mechanism of neurorescue action of rasagiline and ladostigil: new insights and implications for therapy". *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007; 1122: 155-168.
269. Ting JT, Kelley BG, Sullivan JM. "Synaptotagmin IV does not alter excitatory fast synaptic transmission or fusion pore kinetics in mammalian CNS neurons". *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006; 26(2): 372-380.
270. Samadi A, de los Rios C, Bolea I y col. "Multipotent MAO and cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: synthesis, pharmacological analysis and molecular modeling of heterocyclic substituted alkyl and cycloalkyl propargyl amine". *European journal of medicinal chemistry*. 2012; 52: 251-262.
271. Samadi A, Chioua M, Bolea I y col. "Synthesis, biological assessment and molecular modeling of new multipotent MAO and cholinesterase inhibitors as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease". *European journal of medicinal chemistry*. 2011; 46(9): 4665-4668.
272. Bolea I, Juarez-Jimenez J, de Los Rios C y col. "Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of donepezil and N-[(5-(benzyloxy)-1-methyl-1H-indol-2-yl)methyl]-N-methylprop-2-yn-1-amine hybrids as new multipotent cholinesterase/monoamine oxidase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease". *Journal of medicinal chemistry*. 2011; 54(24): 8251-8270.
273. Triggle DJ. "The 1,4-dihydropyridine nucleus: a pharmacophoric template part 1. Actions at ion channels". *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2003; 3(3): 215-223.
274. Ooyama Y, Shimada Y, Kagawa Y y col. "Photovoltaic performance of dye-sensitized solar cells based on donor-acceptor pi-conjugated benzofuro[2,3-c]oxazolo[4,5-a]carbazole-type fluorescent dyes with a carboxyl group at different positions of the chromophore skeleton". *Organic & biomolecular chemistry*. 2007; 5(13): 2046-2054.

275. Ooyama Y, Inoue S, Asada R y col. "Dye-Sensitized Solar Cells Based on a Novel Fluorescent Dye with a Pyridine Ring and a Pyridinium Dye with the Pyridinium Ring Forming Strong Interactions with Nanocrystalline TiO₂ Films". *Eur J Org Chem*. 2010; 10: 92-100.
276. Yan X, Cheng S, Sun L y col. " π -conjugated polymers containing pendant Mn₁₂ cluster: Synthesis and physical properties". *Polymer*. 2012; 53: 241-247.
277. Valverde IE, Delmas AF, Aucagne V. "Click a la carte: robust semi-orthogonal alkyne protecting groups for multiple successive azide/alkyne cycloadditions". *Tetrahedron*. 2009; 65: 7597-7602.
278. Cerat P, Gritsch PJ, Goudreau SR y col. "Synthesis of enantioenriched allenes from 1,1-cyclopropanediester". *Organic letters*. 2010; 12(3): 564-567.
279. Castells JC, F. "Tablas para la elucidación estructural de compuestos". Madrid: Alhambra Longman; 1994 1994.
280. Ilic N, Habus I, Barkawi LS y col. "Aminoethyl-substituted indole-3-acetic acids for the preparation of tagged and carrier-linked auxin". *Bioorg Med Chem*. 2005; 13(9): 3229-3240.
281. Kleinman SH. "The bimolecular aliphatic Mannich and related reactions". In: Trost BMF, I., editor. *Comprehensive Organic Synthesis*. 2. Oxford: Pergamon Press; 1991.
282. Zhang H-C, Brumfield KK, Jaroskova L y col. "Facile substitution of resin-bound indoles via the Mannich reaction". *Tetrahedron Lett*. 1998; 39: 4449-4452.
283. Dai H-G, Li J-T, Li T-S. "Efficient and practical synthesis of Mannich bases related to gramine mediated by zinc chloride". *Synth Commun*. 2006; 36: 1829-1835.
284. Li J-T, Sun S-F, Sun M-X. "Improved synthesis of 3-(dialkylaminomethyl)-indole in acetic acid aqueous solution under ultrasound irradiation". *Ultrason Sonochem*. 2011; 18: 42-44.
285. Gurer-Orhan H, Suzen S. "Melatonin, its metabolites and its synthetic analogs as multi-faceted compounds: antioxidant, prooxidant and inhibitor of bioactivation reactions". *Curr Med Chem*. 2015; 22(4): 490-499.
286. Aiello F, Valacchi G. "Synthesis and evaluation of indole based molecules for treatment of oxidative stress related diseases". *Curr Top Med Chem*. 2014; 14(22): 2576-2589.
287. Palmieri A, Petrini M, Shaikh RR. "Synthesis of 3-substituted indoles via reactive alkylideneindolenine intermediates". *Org Biomol Chem*. 2010; 8(6): 1259-1270.
288. Chauder B, Larkin A, Snieckus V. "Rapid Route to 3,4-Substituted Indoles via a Directed Ortho Metalation-Retro-Mannich Sequence". *Org Lett*. 2002; 4: 815-817.
289. Li S-G, Zard SZ. "A Convenient Metal-Free Reagent for the Generation and Capture of Trifluoromethanethiol". *Org Lett*. 2013; 15: 5898-5901.
290. Langlois Y, Potier P. "Indoles. IX. Total syntheses of (+)-deethylervatamine and (+)-15,20-dehydroervatamine". *Tetrahedron*. 1975; 31: 423-428.

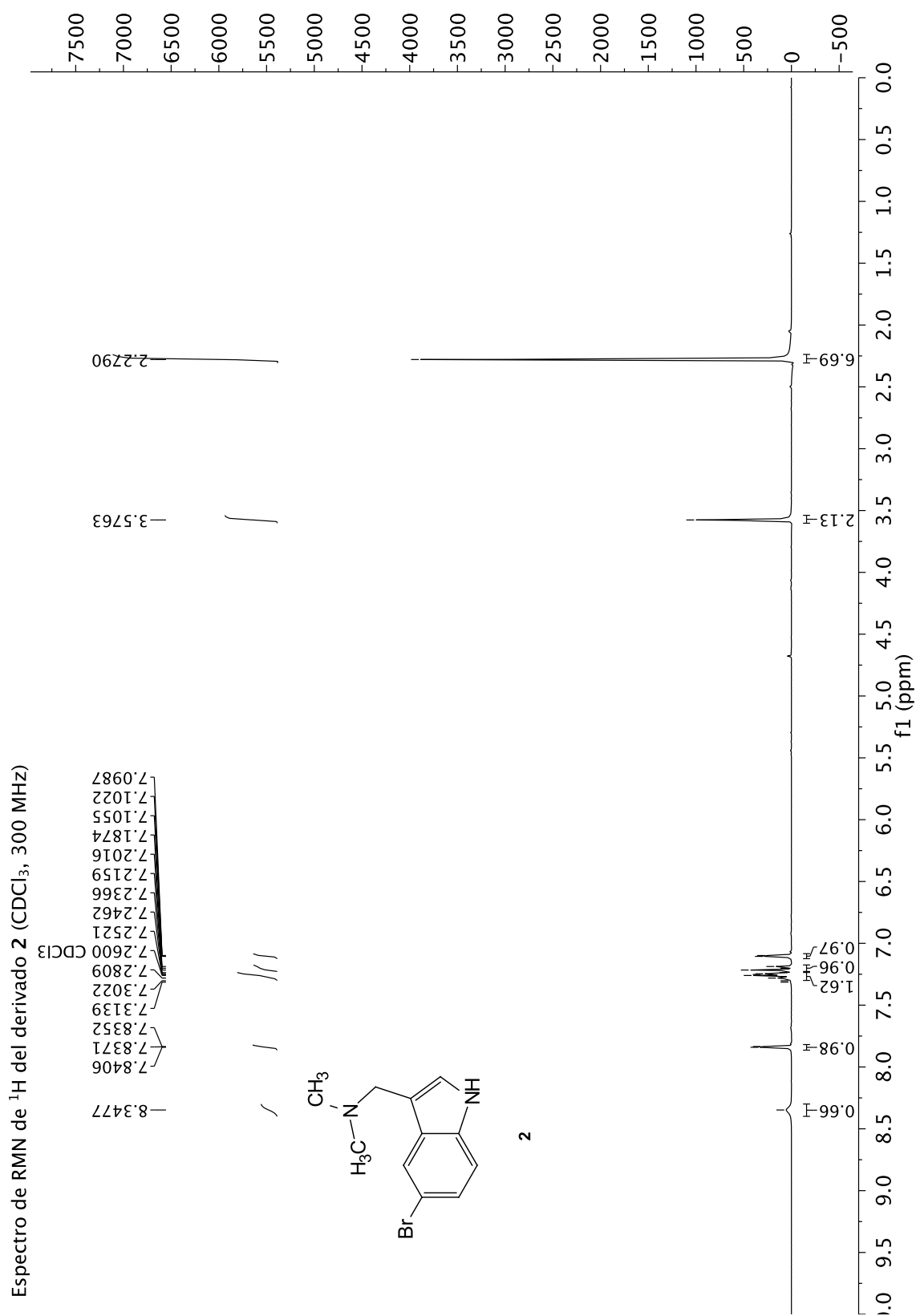
291. Cornforth JW, Cornforth RH, Dalglish CE y col. "DL- β -(3-Oxindolyl)alanine (DL-hydroxytryptophan). I. Synthesis". *Biochem J*. 1951; 48: 591-597.
292. Kulagowski JJ, Broughton HB, Curtis NR y col. "3-[[4-(4-Chlorophenyl)piperazin-1-yl]methyl]-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine: An Antagonist with High Affinity and Selectivity for the Human Dopamine D4 Receptor". *J Med Chem*. 1996; 39: 1941-1942.
293. Stanimirovic DB, Bani-Yaghoub M, Perkins M y col. "Blood-brain barrier models: in vitro to in vivo translation in preclinical development of CNS-targeting biotherapeutics". *Expert opinion on drug discovery*. 2015; 10(2): 141-155.
294. Clark DE. "In silico prediction of blood-brain barrier permeation". *Drug discovery today*. 2003; 8: 927-933.
295. Abbott NJ, Dolman DE, Patabendige AK. "Assays to predict drug permeation across the blood-brain barrier, and distribution to brain". *Current drug metabolism*. 2008; 9(9): 901-910.
296. Bickerton GR, Paolini GV, Besnard J y col. "Quantifying the chemical beauty of drugs". *Nat Chem*. 2012; 4: 90-98.
297. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW y col. "Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings". *Adv Drug Delivery Rev*. 2001; 46: 3-26.
298. Wager TT, Hou X, Verhoest PR y col. "Moving beyond rules: the development of a central nervous system multiparameter optimization (CNS MPO) approach to enable alignment of druglike properties". *ACS chemical neuroscience*. 2010; 1(6): 435-449.
299. van de Waterbeemd H, Camenisch G, Folkers G y col. "Estimation of blood-brain barrier crossing of drugs using molecular size and shape, and H-bonding descriptors". *Journal of drug targeting*. 1998; 6(2): 151-165.
300. Norinder U, Haeberlein M. "Computational approaches to the prediction of the blood-brain distribution". *Advanced drug delivery reviews*. 2002; 54(3): 291-313.
301. Mahar Doan KM, Humphreys JE, Webster LO y col. "Passive permeability and P-glycoprotein-mediated efflux differentiate central nervous system (CNS) and non-CNS marketed drugs". *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2002; 303(3): 1029-1037.
302. Pajouhesh H, Lenz GR. "Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs". *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2005; 2(4): 541-553.
303. Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB y col. "Principles of early drug discovery". *British journal of pharmacology*. 2011; 162(6): 1239-1249.
304. Hitchcock SA. "Structural modifications that alter the P-glycoprotein efflux properties of compounds". *Journal of medicinal chemistry*. 2012; 55(11): 4877-4895.
305. Gonzalez-Lafuente L, Egea J, Leon R y col. "Benzothiazepine CGP37157 and its isosteric 2'-methyl analogue provide neuroprotection and block cell calcium entry". *ACS Chem Neurosci*. 2012; 3(7): 519-529.

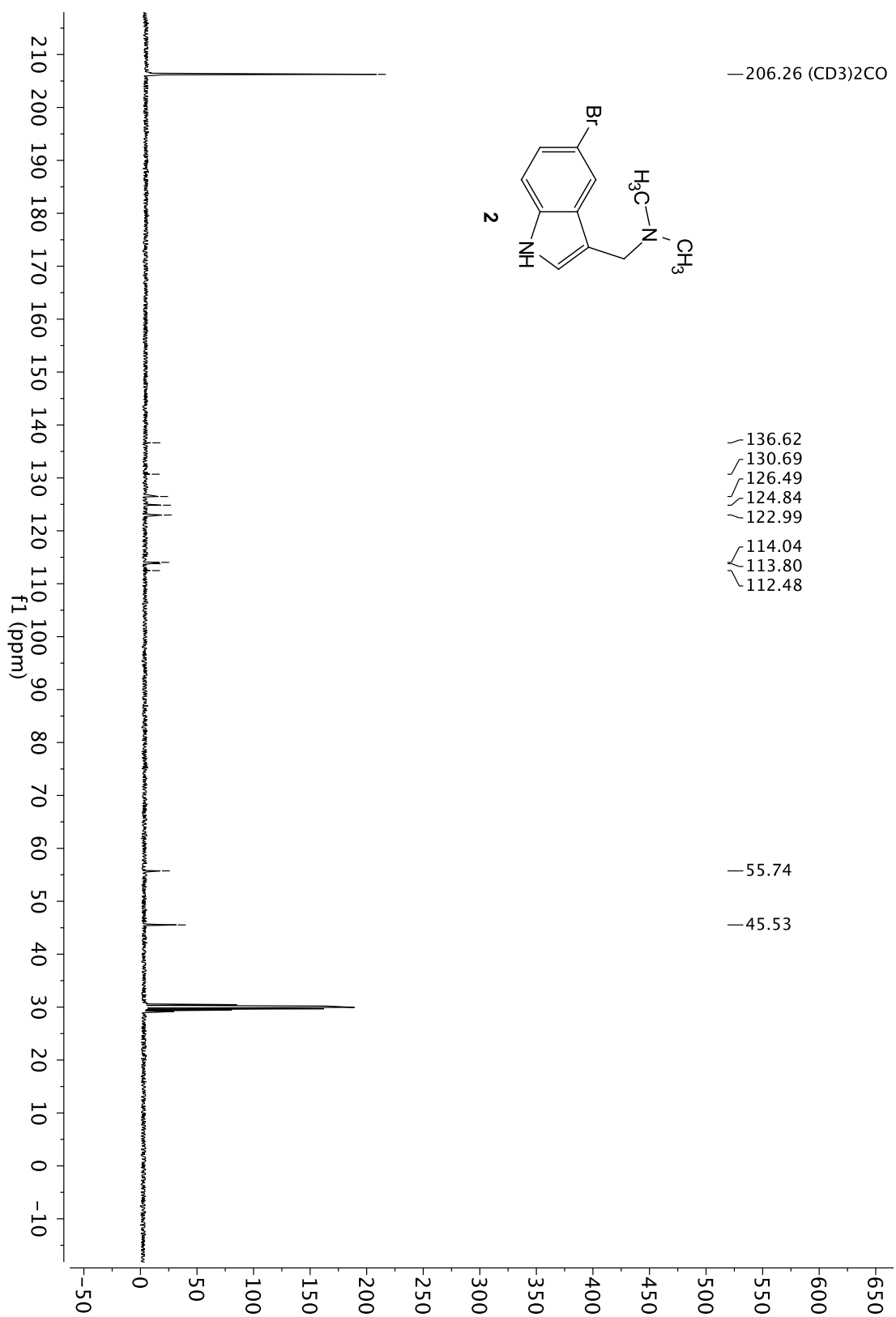
306. Sousa SR, Vetter I, Ragnarsson L y col. "Expression and pharmacology of endogenous Cav channels in SH-SY5Y human neuroblastoma cells". *PloS one*. 2013; 8(3): e59293.
307. Albillos A, Garcia AG, Olivera B y col. "Re-evaluation of the P/Q Ca²⁺ channel components of Ba²⁺ currents in bovine chromaffin cells superfused with solutions containing low and high Ba²⁺ concentrations". *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 1996; 432(6): 1030-1038.
308. Hillyard DR, Monje VD, Mintz IM y col. "A new Conus peptide ligand for mammalian presynaptic Ca²⁺ channels". *Neuron*. 1992; 9(1): 69-77.
309. Killilea SD, Cheng Q, Wang ZX. "Protein phosphatase type 1 and type 2A assays". *Methods Mol Biol*. 1998; 93: 23-33.
310. Baykov AA, Evtushenko OA, Avaeva SM. "A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay". *Analytical biochemistry*. 1988; 171(2): 266-270.
311. Denu JM, Lohse DL, Vijayalakshmi J y col. "Visualization of intermediate and transition-state structures in protein-tyrosine phosphatase catalysis". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(6): 2493-2498.
312. Perez M, Hernandez F, Gomez-Ramos A y col. "Formation of aberrant phosphotau fibrillar polymers in neural cultured cells". *Eur J Biochem*. 2002; 269(5): 1484-1489.
313. Groschner K, Schuhmann K, Mieskes G y col. "A type 2A phosphatase-sensitive phosphorylation site controls modal gating of L-type Ca²⁺ channels in human vascular smooth-muscle cells". *Biochem J*. 1996; 318: 513-517.
314. Yu L, Xu J, Minobe E y col. "Role of protein phosphatases in the run down of guinea pig cardiac Cav1.2 Ca²⁺ channels". *American journal of physiology Cell physiology*. 2016; 310(10): C773-779.
315. Shi J, Gu P, Zhu Z y col. "Protein phosphatase 2A effectively modulates basal L-type Ca²⁺ current by dephosphorylating Cav1.2 at serine 1866 in mouse cardiac myocytes". *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; 418: 792-798.
316. Zheng MQ, Li X, Tang K y col. "Pyruvate restores beta-adrenergic sensitivity of L-type Ca(2+) channels in failing rat heart: role of protein phosphatase". *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2013; 304(10): H1352-1360.
317. duBell WH, Rogers TB. "Protein phosphatase 1 and an opposing protein kinase regulate steady-state L-type Ca²⁺ current in mouse cardiac myocytes". *The Journal of physiology*. 2004; 556(Pt 1): 79-93.
318. Oliveria SF, Dell'Acqua ML, Sather WA. "AKAP79/150 anchoring of calcineurin controls neuronal L-type Ca²⁺ channel activity and nuclear signaling". *Neuron*. 2007; 55(2): 261-275.
319. Nicolau SM, de Diego AM, Cortes L y col. "Mitochondrial Na⁺/Ca²⁺-exchanger blocker CGP37157 protects against chromaffin cell death elicited by veratridine". *J Pharmacol Exp Ther*. 2009; 330(3): 844-854.
320. Kolok S, Nagy J, Szombathelyi Z y col. "Functional characterization of sodium channel blockers by membrane potential measurements in cerebellar neurons: prediction of compound preference for the open/inactivated state". *Neurochem Int*. 2006; 49(6): 593-604.

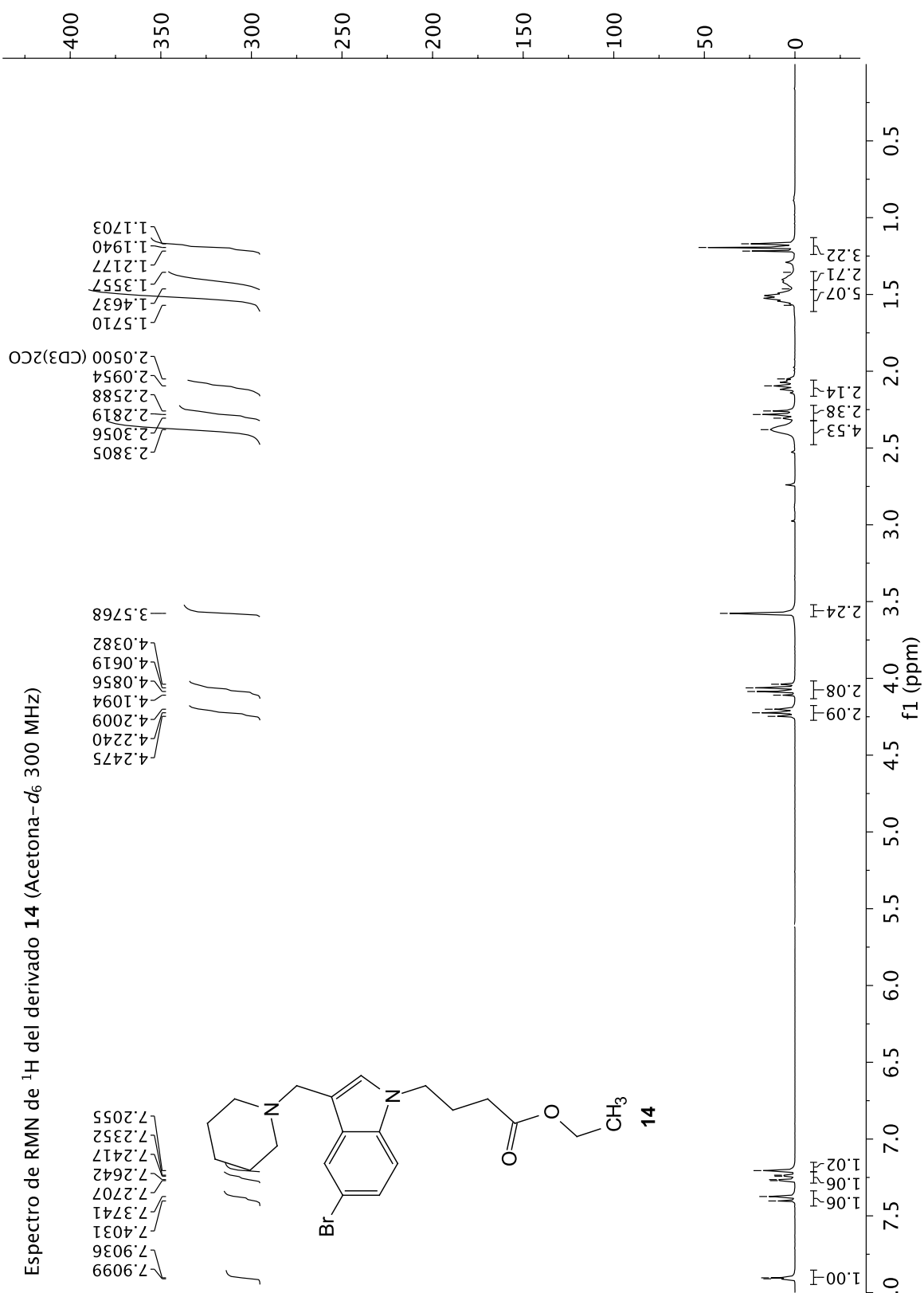
- 321.** Augustinack JC, Schneider A, Mandelkow EM y col. "Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease". *Acta neuropathologica*. 2002; 103(1): 26-35.

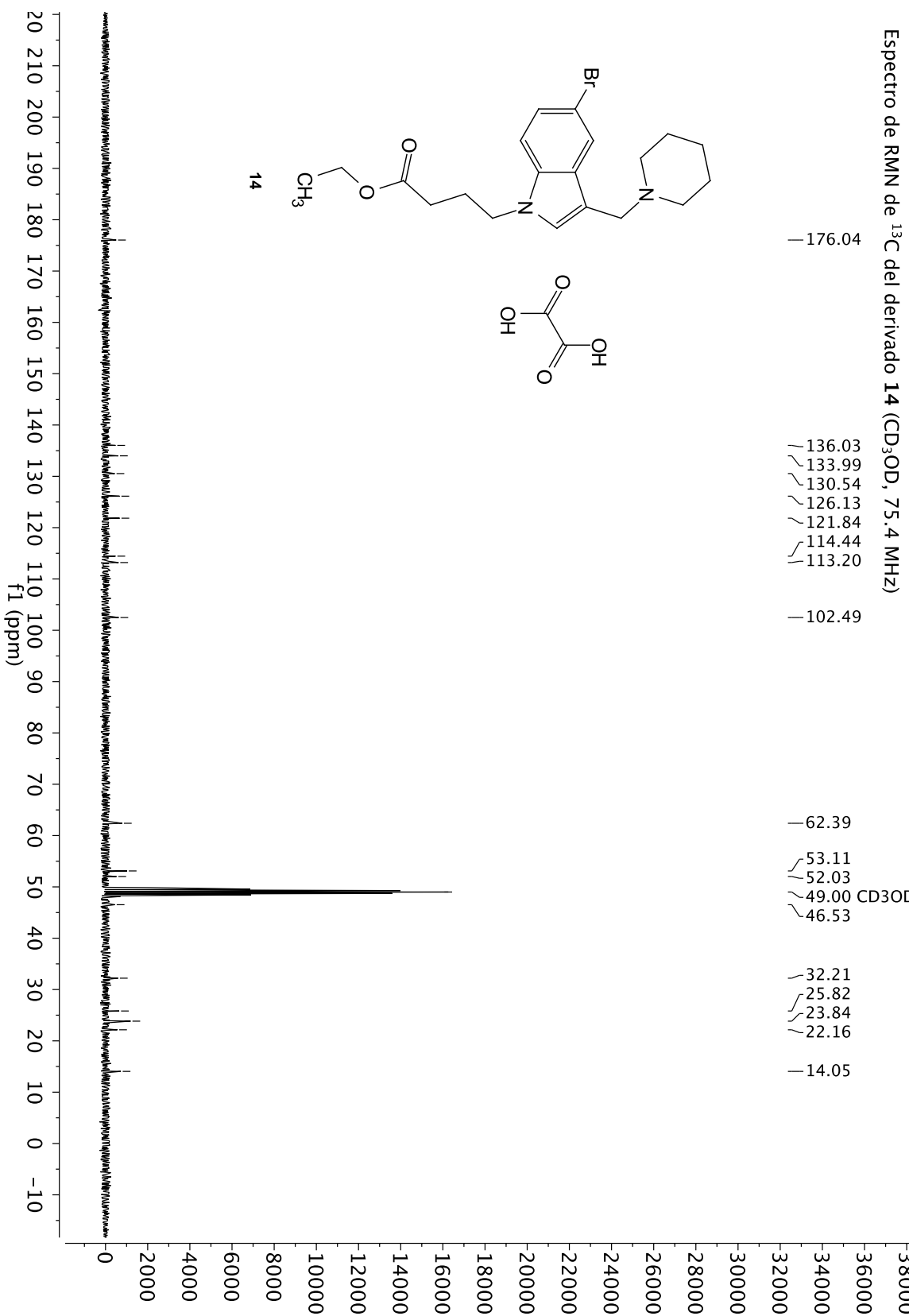
XI. ANEXOS

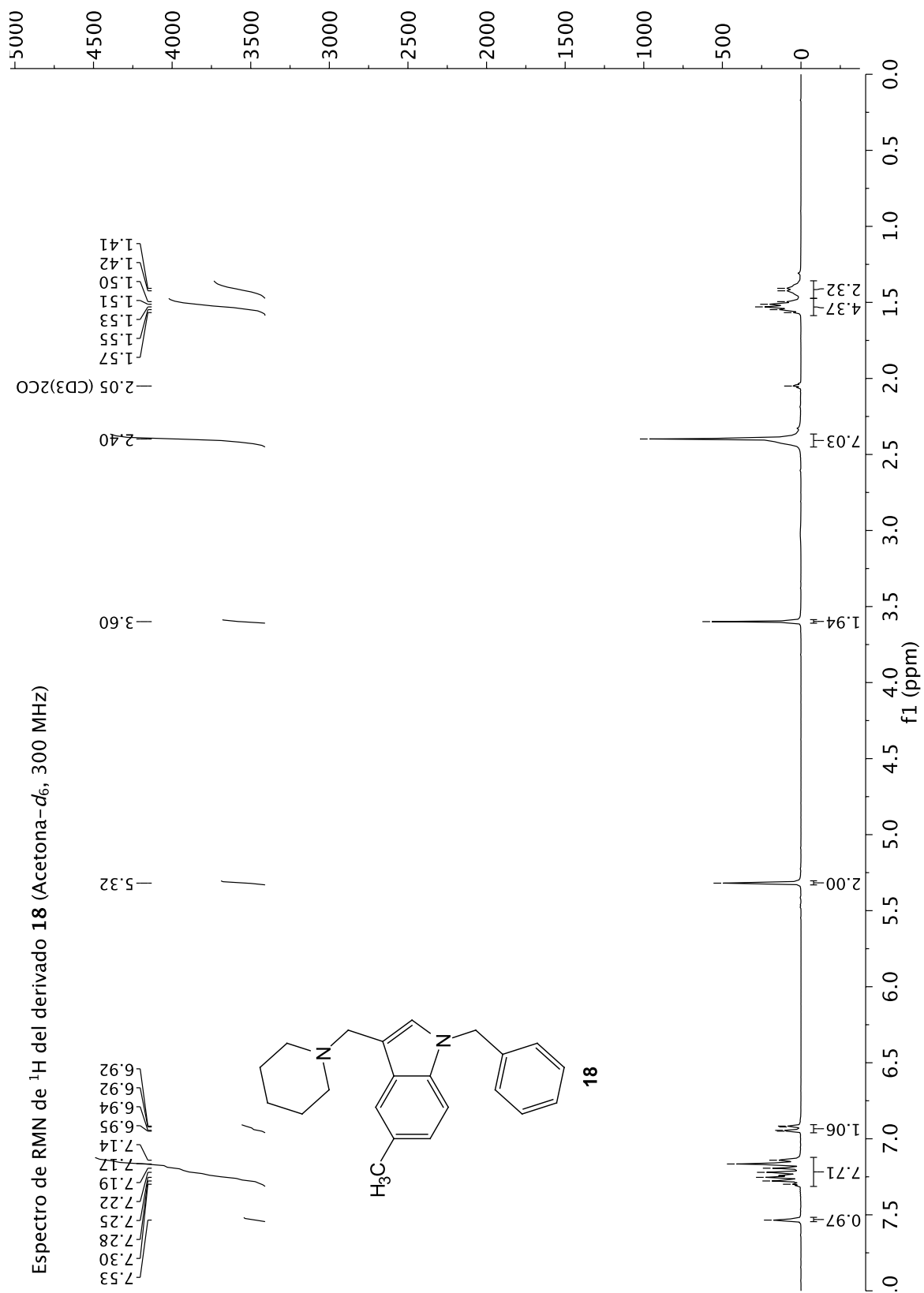
1. ESPECTROS DE RMN DE ^1H Y DE ^{13}C DE LOS DERIVADOS 2, 14 Y 18

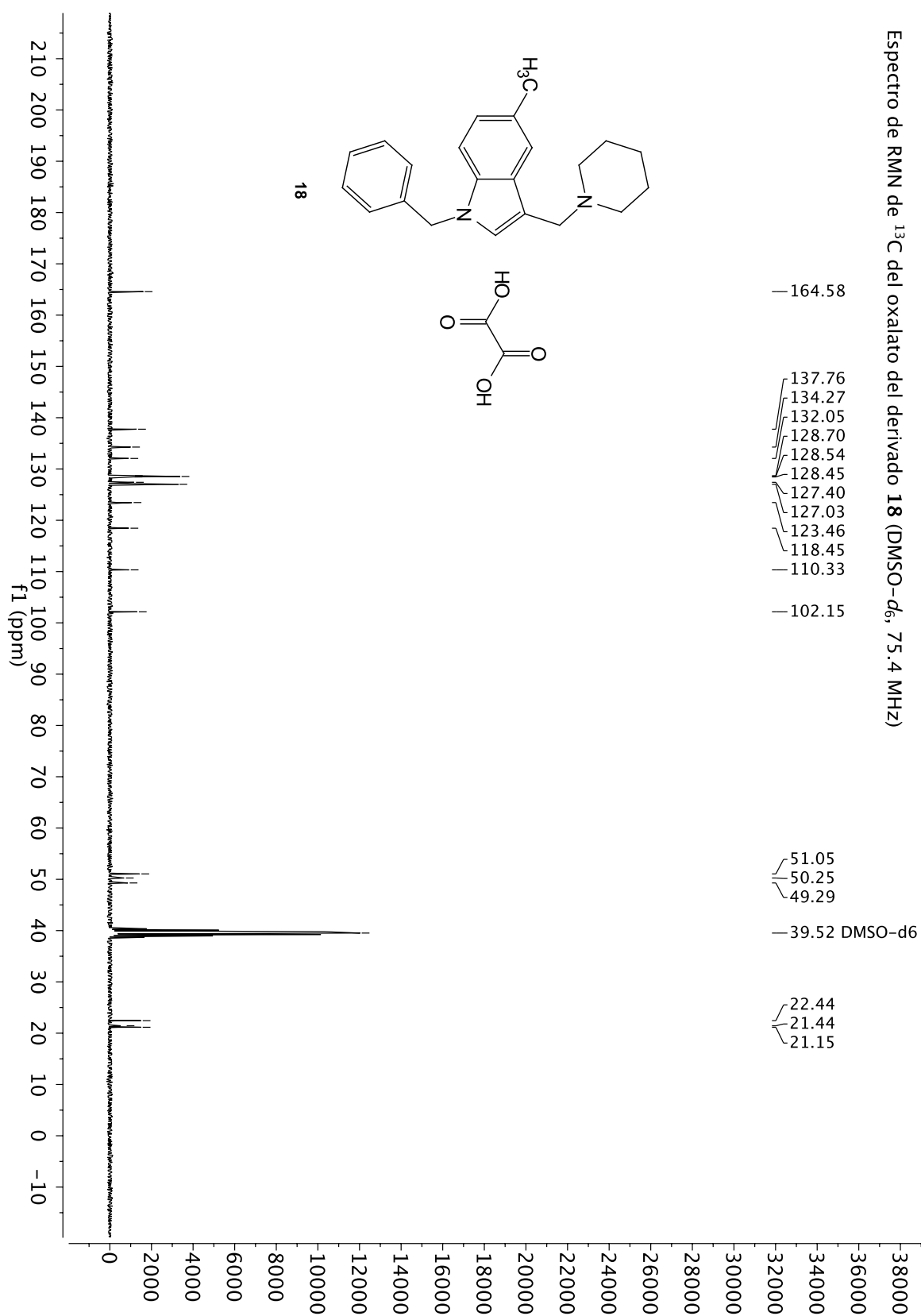


Espectro de RMN de ^{13}C del derivado 2 (Acetona- d_6 , 75.4 MHz)







Espectro de RMN de ^{13}C del oxalato del derivado **18** (DMSO- d_6 , 75.4 MHz)

2. CRISTALOGRAFÍA DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Informe de la estructura cristalina encontrada para el derivado 2

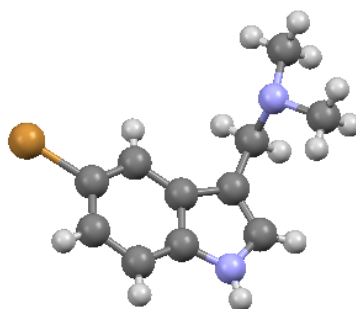
Table 1. Sample and crystal data for **2**.

<i>Chemical formula</i>	C ₁₁ H ₁₃ BrN ₂
<i>Formula weight</i>	253.14
<i>Temperature</i>	293(2) K
<i>Wavelength</i>	0.71073 Å
<i>Crystal size</i>	0.070 x 0.240 x 0.560 mm
<i>Crystal habit</i>	colorless plate
<i>Crystal system</i>	monoclinic
<i>Space group</i>	P 1 21 1
<i>Unit cell dimensions</i>	a = 5.7502(2) Å α = 90° b = 9.6972(3) Å β = 90° c = 10.2121(4) Å γ = 90°
<i>Volume</i>	555.69(3) Å ³
<i>Z</i>	2
<i>Density (calculated)</i>	1.513 g/cm ³
<i>Absorption coefficient</i>	3.662 mm ⁻¹
<i>F(000)</i>	256

Table 2. Data collection and structure refinement for **2**.

<i>Theta range for data collection</i>	2.04 to 25.34°
<i>Index ranges</i>	-6<=h<=6, -11<=k<=11, -12<=l<=12
<i>Reflections collected</i>	17949
<i>Independent reflections</i>	2006 [R(int) = 0.0219]
<i>Coverage of independent reflections</i>	100.0%
<i>Absorption correction</i>	multi-scan
<i>Max. and min. transmission</i>	0.7840 and 0.2340
<i>Refinement method</i>	Full-matrix least-squares on F ²
<i>Refinement program</i>	SHELXL-97 (Sheldrick, 2014)
<i>Function minimized</i>	Σ w(F _o ² - F _c ²) ²
<i>Data / restraints / parameters</i>	2006 / 1 / 129
<i>Goodness-of-fit on F²</i>	1.136
<i>Δ/σ_{max}</i>	0.001
<i>Final R indices</i>	1936data; I>2σ(I) R1 = 0.0226, wR2 = 0.0588 all data R1 = 0.0242, wR2 = 0.0692
<i>Weighting scheme</i>	w=1/[σ ² (F _o ²)+(0.0419P) ² +0.1189P] where P=(F _o ² +2F _c ²)/3
<i>Absolute structure parameter</i>	0.0(0)
<i>Largest diff. peak and hole</i>	0.294 and -0.202 eÅ ⁻³

R.M.S. deviation from mean

0.044 eÅ⁻³

Diffraction data were collected on a Bruker Kappa Apex II diffractometer equipped with Mo source and a graphite monochromator. The software package SHELXTL was used for space group determination, structure solution, absorption correction and refinement (SHELXTL version 6.12, Structure Determination Package, Bruker, Madison, Wisconsin, USA, 2001). The structure was solved by direct methods, completed with difference Fourier syntheses, and refined with anisotropic displacement parameters.

Informe de la estructura cristalina encontrada para el oxalato del derivado 14

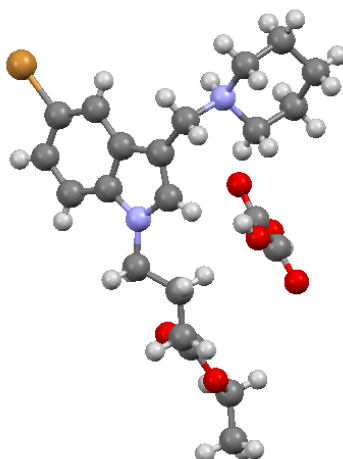
Table 1. Sample and crystal data for compound **14**.

<i>Chemical formula</i>	C ₂₂ H ₂₉ BrN ₂ O ₆	
<i>Formula weight</i>	497.38 g/mol	
<i>Temperature</i>	293(2) K	
<i>Wavelength</i>	0.71073 Å	
<i>Crystal size</i>	0.060 x 0.120 x 0.220 mm	
<i>Crystal habit</i>	clear colourless prismatic	
<i>Crystal system</i>	triclinic	
<i>Space group</i>	P -1	
<i>Unit cell dimensions</i>	a = 8.63310(10) Å	α = 83.8810(10)°
	b = 11.2195(2) Å	β = 86.6320(10)°
	c = 12.4482(3) Å	γ = 71.6680(10)°
<i>Volume</i>	1137.60(4) Å ³	
<i>Z</i>	2	
<i>Density (calculated)</i>	1.452 g/cm ³	
<i>Absorption coefficient</i>	1.847 mm ⁻¹	
<i>F(000)</i>	516	

Table 2. Data collection and structure refinement for compound **14**.

<i>Theta range for data collection</i>	1.65 to 25.35°
<i>Index ranges</i>	-10 ≤ h ≤ 10, -13 ≤ k ≤ 13, -14 ≤ l ≤ 14

<i>Reflections collected</i>	39063
<i>Independent reflections</i>	4166 [R(int) = 0.0413]
<i>Coverage of independent reflections</i>	100.0%
<i>Absorption correction</i>	multi-scan
<i>Max. and min. transmission</i>	0.8970 and 0.6870
<i>Structure solution technique</i>	direct methods
<i>Structure solution program</i>	SHELXS-97 (Sheldrick 2008)
<i>Refinement method</i>	Full-matrix least-squares on F^2
<i>Refinement program</i>	SHELXL-2014/7 (Sheldrick, 2014)
<i>Function minimized</i>	$\Sigma w(F_o^2 - F_c^2)^2$
<i>Data / restraints / parameters</i>	4166 / 1 / 281
<i>Goodness-of-fit on F^2</i>	1.064
<i>Δ/σ_{\max}</i>	0.001
<i>Final R indices</i>	3040 data; $I > 2\sigma(I)$ R1 = 0.0649, wR2 = 0.1816 all data R1 = 0.0890, wR2 = 0.2055
<i>Weighting scheme</i>	$w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.1037P)^2 + 2.0809P]$ where $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$
<i>Largest diff. peak and hole</i>	1.155 and -0.708 $\text{e}\text{\AA}^{-3}$
<i>R.M.S. deviation from mean</i>	0.090 $\text{e}\text{\AA}^{-3}$



Diffraction data were collected on a Bruker Kappa Apex II diffractometer equipped with Mo source and a graphite monochromator. The software package SHELXTL was used for space group determination, structure solution, absorption correction and refinement (SHELXTL version 6.12, Structure Determination Package, Bruker, Madison, Wisconsin, USA, 2001). The structure was solved by direct methods, completed with difference Fourier syntheses, and refined with anisotropic displacement parameters.